

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA I



TESIS DOCTORAL

**Análisis estructural y presencia de autofluorescencia en biopelículas formadas
por micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

María del Carmen Muñoz Egea

Directores

Jaime Esteban Moreno
Carmen Rodríguez-Avial López-Dóriga

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y PRESENCIA DE
AUTOFLUORESCENCIA EN BIOPELÍCULAS FORMADAS
POR MICOBACTERIAS NO PIGMENTADAS DE
CRECIMIENTO RÁPIDO**

TESIS DOCTORAL

María del Carmen Muñoz Egea

Directores: Jaime Esteban Moreno y Carmen Rodríguez-Avial López-Dóriga

Madrid, 2014

ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y PRESENCIA DE AUTOFLUORESCENCIA EN BIOPELÍCULAS FORMADAS POR MICOBACTERIAS NO PIGMENTADAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO

Tesis Doctoral presentada por:

MARÍA DEL CARMEN MUÑOZ EGEA

Directores de la Tesis:

Dr. JAIME ESTEBAN MORENO

Dra. CARMEN RODRÍGUEZ-AVIAL LÓPEZ-DÓRIGA

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I



D. Jaime Esteban Moreno, Doctor en Medicina y Cirugía, especialista en Microbiología y Parasitología Clínica, profesor asociado de Microbiología de la Universidad Autónoma de Madrid, y Dña. Carmen Rodríguez-Avial López-Dóriga, Doctora en Medicina, profesora titular de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que Dña. MARÍA DEL CARMEN MUÑOZ EGEA, Licenciada en Farmacia y especialista en Microbiología y Parasitología Clínica, ha completado bajo su dirección los trabajos conducentes a la obtención de resultados para optar al título de DOCTOR por la Universidad Complutense de Madrid. Y en vista de lo adecuado de su desarrollo, se autoriza la presentación de esta Tesis Doctoral para su evaluación.

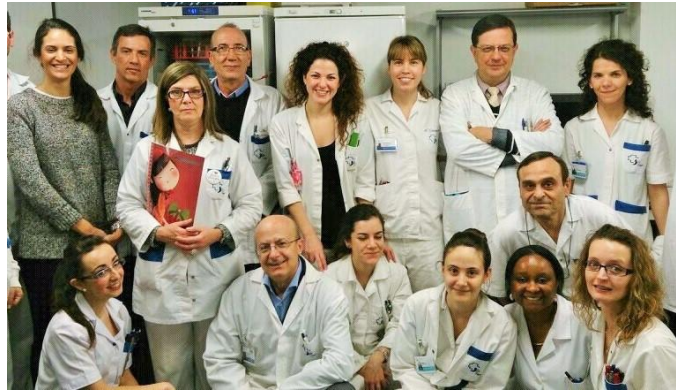
Y para que conste, se firma en Madrid, a 14 de Octubre de 2014.

Fdo.: Dr. Jaime Esteban Moreno

Fdo.: Dra. Carmen Rodríguez-Avial López-Dóriga

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que directa o indirectamente han sido partícipes del presente trabajo, por su apoyo incondicional, sus sabias palabras, consejos y ayuda. Me siento, por todo ello, una persona muy afortunada al poder tenerles a mi lado.



En el ámbito profesional, quiero hacer patente mi agradecimiento a:

Mis directores de tesis: el Dr. Jaime Esteban y a la Dra. Carmen Rodríguez-Avial; el Dr. Esteban me sugirió el tema para esta tesis y además de su valiosa dirección ha hecho posible completar este trabajo con sus enseñanzas, constante ayuda y permanente accesibilidad. La Dra. Rodríguez-Avial ha supervisado mi trabajo y me ha dado consejos de relevancia en momentos críticos.

A mi tutor durante mi residencia, el Dr. Ricardo Fernández Roblas, y los Dres. Ignacio Gadea y Javier Zapardiel, que además de haberme formado como especialista en Microbiología han estimulado mi curiosidad y afición por la investigación durante los cuatro años de residencia.

Debo también expresar mi agradecimiento a los técnicos, becarios y residentes del departamento de Microbiología del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz con quienes he compartido mis años de formación y de quienes he aprendido a trabajar en equipo y a disfrutar del estudio y la investigación.

Quiero expresar un agradecimiento muy especial para Curra, técnico de microscopía confocal, gracias a quien pude llevar a cabo la parte de esta tesis que hace uso de esta técnica de imagen. Muy importante también ha sido la ayuda recibida de Ignacio Mahillo en el análisis estadístico de este trabajo.

DEDICATORIA

En un ámbito más personal, dedico este trabajo a todas aquellas personas que han estado siempre a mi lado y sin las cuales este camino hubiera sido más difícil. No hay palabras para expresar todo lo que habéis hecho por mí.

A todos mis amigos, por su gran cariño y su amistad, por estar siempre conmigo y por compartir tantos buenos momentos juntos. Especial agradecimiento a Sylvia Powell y a Diego por la ayuda recibida.

A mi familia, mis padres y mi hermano Raúl, por apoyarme y motivarme en todo momento, y sin los cuales todo esto nunca hubiera sido posible. Y a Jorge, gracias por todo tu apoyo y ayuda incondicionales, por estar a mi lado y ser otro de los motores importantes en mi vida.

For my English speaking friends...

My gratitude to all the people that in one way or another have helped me to accomplish this PhD work.

The whole work of this PhD thesis is deeply inspired by the contributions made in this field by Professor



Joseph O. Falkinham, III (Blacksburg, Virginia, USA). During a 3-month period in his laboratory at Virginia Polytechnic Institute and State University (Virginia Tech) I profited from his direct and patient teaching, an experience that will hugely influence my professional career. I want to thank Professor Falkinham for his generosity and friendship. Two illustrations within the introduction belong to specimens I studied at Professor Falkinham's laboratory.

I also extend my gratitude to all the members of the Department of Biological Sciences at Virginia Tech for their technical and professional help.

Finally, I wish to thank my friends from Blacksburg who undoubtedly contributed to making my stay a wonderful experience.

Madrid, 2014

MARÍA DEL CARMEN MUÑOZ EGEA

A mis padres, a mi hermano y a Jorge.

PUBLICACIONES ORIGINALES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS RELACIONADOS CON LA TESIS

PUBLICACIONES

1. Effect of anti-biofilm agents alone and combined with antibiotics on the ultrastructure and development of rapidly growing mycobacteria biofilms. **María-Carmen Muñoz-Egea**, María García Pedrazuela, Ignacio Mahillo, Jaime Esteban Moreno. Submitted. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2014 Oct.
2. Historical evolution of the diseases caused by Non-Pigmented Rapidly Growing Mycobacteria. 1990-2012. Concepción Pérez-Jorge, María García-Pedrazuela, **María-Carmen Muñoz-Egea** and Jaime Esteban. Under review. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2014 Sep.
3. Polyclonality among clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria: Phenotypic and genotypic differences and their potential implications. García-Pedrazuela, María; Frutos, Jose-María; **Muñoz-Egea, María-Carmen**; Alcaide, Fernando; Tórtola, María Teresa; Vitoria, Asunción; Cortes, María-Pilar; Esteban, Jaime. Under review. Clinical Microbiology and Infection. 2014 Aug.
4. Effect of ciprofloxacin in the ultrastucture and development of biofilms formed by rapidly growing mycobacteria. **María-Carmen Muñoz-Egea**, María García-Pedrazuela, Ignacio Mahillo, Jaime Esteban-Moreno. Under review. BMC Microbiology. 2014 Sep.
5. In vitro susceptibility of rapidly growing mycobacteria biofilms against different antimicrobials. **María-Carmen Muñoz-Egea**, María García-Pedrazuela, Jaime Esteban-Moreno. In press. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014 Jul 11.
6. Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update. Jaime Esteban, María García-Pedrazuela, **María-Carmen Muñoz-Egea** & Fernando Alcaide. Expert Opin Pharmacother. 2012 May;13(7):967-86.

7. Autofluorescence as a tool for the structural analysis of biofilms formed by non-pigmented rapidly growing mycobacteria. **María-Carmen Muñoz-Egea**, María García-Pedrazuela, Ignacio Mahillo, María-Jesus García, and Jaime Esteban. Appl Environ Microbiol. 2013 Feb;79(3):1065-7.

PUBLICACIONES EN MULTIMEDIA (SOPORTE INFORMÁTICO)

1. Infección respiratoria por *Mycobacterium abscessus*. María García Pedrazuela, **M^a Carmen Muñoz Egea** y Jaime Esteban Moreno. Casos de microbiología clínica de Soria-Melguizo. 2013 Sept. <http://www.f-soria.es/admfsoria/casos/img/caso%20575.pdf>

COMUNICACIONES ORALES EN CONGRESOS

1. Estudio de la concentración mínima de erradicación de biopelículas de micobacterias de crecimiento rápido frente a diferentes antimicrobianos. Aspectos microbiológicos y clínicos de las infecciones por micobacterias. **M.C. Muñoz Egea**, M. García Pedrazuela, J. Esteban Moreno. XVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Valencia, España. 9-11 abril 2014.

2. Detección de autofluorescencia en biopelículas de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido. **María del Carmen Muñoz Egea**, María García Pedrazuela, María Jesús García, Jaime Esteban. XVI Reunión del Grupo Español de Micobacteriología (GEM). Córdoba, España. 22-24 Marzo 2012.

PÓSTERS Y PUBLICACIONES EN CONGRESOS

1. Publicación: Adaptive antibiotic-resistance in nontuberculous mycobacteria. **M.C. Muñoz Egea**, J. Esteban Moreno, Joseph Falkinham III. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelona, España. 10-13 Mayo 2014.

2. Póster: Effect of ciprofloxacin in the ultrastructure and development of biofilms formed by rapidly growing mycobacteria. Mycobacterial susceptibility and molecular epidemiology. **M.C. Muñoz Egea**, M. García-Pedrazuela, J. Esteban. Department of Microbiology, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelona, España. 10-13 Mayo 2014.

3. Póster: Polyclonality of non-pigmented rapidly growing mycobacteria (NPRGM): Phenotypic and genotypic differences and their potential implications. María García-Pedrazuela, Jose-María Frutos, **María-Carmen Muñoz-Egea**, Fernando Alcaide, Teresa Tórtola, Asunción Vitoria, Pilar Cortés, Jaime Esteban. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelona, España. 10-13 Mayo 2014.

4. Póster: Estudio de la policlonalidad en aislamientos clínicos de micobacterias de crecimiento rápido. J.M. Caldito, **M.C. Muñoz-Egea**, J.M. Frutos, M. García-Pedrazuela, T. Tórtola, A. Vitoria, J. Esteban, F. Alcaide. XVII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Zaragoza, España. 29-31 Mayo 2013.

5. Póster: Detección de autofluorescencia en biopelículas de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido. Aspectos microbiológicos y clínicos de las infecciones por micobacterias. M. García Pedrazuela, **M.C. Muñoz Egea**, J. Esteban Moreno. XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Bilbao, España. 9-11 Mayo 2012.

6. Publicación: Detection of autofluorescence in biofilms formed by rapidly growing mycobacteria. **M.C. Muñoz-Egea**, M. García-Pedrazuela, M.J. García, J. Esteban. Programme Committee of the 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Londres, Inglaterra. 31 Marzo-3 Abril 2012.

7. Póster: Detección de autofluorescencia en biopelículas de micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido. **María del Carmen Muñoz Egea**, María García Pedrazuela, María Jesús García, Jaime Esteban. XVI Reunión del Grupo Español de Micobacteriología (GEM). Córdoba, España. 22-24 Marzo 2012.

OTRAS PUBLICACIONES ORIGINALES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS SOBRE MICOBACTERIAS

PUBLICACIONES

1. Exclusion of *Mycobacterium avium* from Household Plumbing Biofilms by *Methylobacterium spp.* **María-Carmen Muñoz Egea**, Summer N. Mullis, Amy Pruden, Leah Lande, Joseph O. Falkinham, III. Under review. Appl Environ Microbiol. 2014 Oct.
2. Clinical and microbiological characteristics of patients with septic arthritis: A hospital-based study. **María-Carmen Muñoz-Egea**, Antonio Blanco, Ricardo Fernández-Roblas, Ignacio Gadea, Joaquín García-Cañete, Enrique Sandoval, María Valdazo, Jaime Esteban. J Orthop. 2014 May 9;11(2):87-90.

COMUNICACIONES ORALES EN CONGRESOS

1. Características clínicas y microbiológicas de la artritis séptica aguda en un Hospital Universitario. **M.C. Muñoz Egea**, A. Blanco, R. Fernandez Roblas, I. Gadea, J. García Cañete, E. Sandoval, M. Valdazo y J. Esteban. XVII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Zaragoza, España. 29-31 Mayo 2013.
2. Evaluación del uso del Quantiferon para el manejo de la infección tuberculosa latente en el Servicio de Salud Laboral en un Hospital Universitario: 2007-2011. C. Pérez-Jorge Peremarch, **M.C. Muñoz Egea**, M. García Pedrazuela, H. Fouad Salih, T. Del Campo Balsa, J. Esteban Moreno. XVI Reunión del Grupo Español de Micobacteriología (GEM). Córdoba, España. 22-24 Marzo 2012.

3. Estudio retrospectivo del uso del QFT en relación con el Mantoux en un Hospital de tercer nivel. M. García Pedrazuela, **M.C. Muñoz Egea**, C. Pérez-Jorge Peremarch, J. Esteban Moreno. XVI Reunión del Grupo Español de Micobacteriología (GEM). Córdoba, España. 22-24 Marzo 2012.

PÓSTERS EN CONGRESOS

1. Póster: PCR separation of *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium chimaera*. Recent advances in molecular diagnosis. **M.C. Muñoz Egea**, J. Esteban Moreno, Joseph Falkinham III. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Barcelona, España. 10-13 Mayo 2014.

2. Póster: Evaluación del uso del Quantiferon para el manejo de la infección tuberculosa latente en el Servicio de Salud Laboral en un Hospital Universitario: 2007-2011. Aspectos microbiológicos y clínicos de las infecciones por micobacterias. C. Pérez-Jorge Peremarch, **M.C. Muñoz Egea**, M. García Pedrazuela, H. Fouad Salih, T. Del Campo Balsa, J. Esteban Moreno. XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Bilbao, España. 9-11 Mayo 2012.

3. Póster: Estudio retrospectivo del uso del QFT en relación con el Mantoux en un Hospital de tercer nivel. Aspectos microbiológicos y clínicos de las infecciones por micobacterias. **M.C. Muñoz Egea**, M. García Pedrazuela, C. Pérez-Jorge Peremarch, J. Esteban Moreno. XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Bilbao, España. 9-11 Mayo 2012.

4. Póster: Evaluation of the use of Quantiferon TB-Gold in the routine setting at a university hospital, 2007-2011. M. García-Pedrazuela, **M.C. Muñoz-Egea**, C. Pérez-Jorge, J. Esteban. Programme Committee of the 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Londres, Inglaterra. 31 Marzo-3 Abril 2012.

5. Póster: Evaluación del uso del Quantiferon para el manejo de la infección tuberculosa latente en el Servicio de Salud Laboral en un Hospital Universitario: 2007-2011. C. Pérez-Jorge Peremarch, **M.C. Muñoz Egea**, M. García Pedrazuela, H. Fouad Salih, T. Del Campo Balsa, J. Esteban Moreno. XVI Reunión del Grupo Español de Micobacteriología (GEM). Córdoba, España. 22-24 Marzo 2012.

6. Póster: Estudio retrospectivo del uso del QFT en relación con el Mantoux en un Hospital de tercer nivel. M. García Pedrazuela, **M.C. Muñoz Egea**, C. Pérez-Jorge Peremarch, J. Esteban Moreno. XVI Reunión del Grupo Español de Micobacteriología (GEM). Córdoba, España. 22-24 Marzo 2012.

BECAS

BECA PARA ESTANCIAS EN EL EXTRANJERO

Beneficiaria de una ayuda otorgada por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) para realizar una estancia en un centro de investigación extranjero en el ámbito de la Microbiología Clínica y de las Enfermedades Infecciosas.

Dicha estancia fue realizada en el Departamento de Ciencias Biológicas de Blacksburg (Virginia, Estados Unidos) desde el 28 de julio al 31 de octubre de 2013 bajo tutela del Profesor Joseph O. Falkinham, III, un reconocido profesor de Microbiología en EE.UU. y prestigioso investigador a nivel mundial. Concretamente, llevé a cabo tres líneas de investigación sobre micobacterias de crecimiento rápido, orientadas a la identificación molecular, estudios de sensibilidad y desarrollo de biopelículas, las cuales han dado lugar a varias comunicaciones en congresos (*24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) y publicaciones científicas en revistas de prestigio internacional (algunas de ellas en desarrollo), también en colaboración con otras Universidades americanas (Universidad de Texas, Profesor Richard Wallace).

BECAS DE INVESTIGACIÓN

Los trabajos de investigación recogidos en la presente tesis han sido desarrollados gracias a la financiación recibida por parte del Ministerio de Ciencia y Tecnología a través del Proyecto FUNCOAT-CONSOLIDER-CSD2008-00023 y por parte de la Comunidad de Madrid a través del Proyecto BITI-S2009/MAT-1472-1.

ÍNDICE

RESUMEN EN ESPAÑOL.....	1
ENGLISH SUMMARY	9
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. El género <i>Mycobacterium</i>	19
1.2. Micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido	20
1.2.1. Definición.....	20
1.2.2. Clasificación	20
1.3. Epidemiología	22
1.4. Patología humana.....	24
1.5. Diagnóstico	29
1.5.1 Estudios de laboratorio.....	29
1.5.2. Estudios de imagen.....	32
1.5.3. Otras pruebas diagnósticas	33
1.5.4. Criterios ATS/IDSA	33
1.5.5. Procedimientos invasivos	35
1.5.6. La autofluorescencia como herramienta diagnóstica	35
1.6. Manejo clínico y terapéutico.....	36
1.6.1. Tratamiento quirúrgico.....	37
1.7. Sensibilidad <i>in vitro</i> y mecanismos de resistencia antibiótica	38
1.7.1. Metilasas y genes <i>erm</i> como mecanismo de resistencia a macrólidos.....	38

1.7.1.1. Definición	38
1.7.1.2. Tipos de metilasa.....	39
1.8. Biopelículas.....	39
1.8.1. Definición.....	39
1.8.2. Crecimiento planctónico frente a crecimiento en biopelícula	42
1.8.3. La adherencia primaria y el desarrollo de la biopelícula.....	42
1.8.4. Regulación del proceso de formación de la biopelícula.....	44
1.8.5. Biopelículas bacterianas e infección.....	44
1.8.5.1. Detección de biopelículas en dispositivos médicos.....	46
1.8.6. Biopelículas y resistencia antibiótica.....	46
1.8.7. Biopelículas y tratamiento.....	49
2. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO	53
3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	57
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
4.1. Micobacterias empleadas en los estudios	63
4.1.1. Cepas de colección	63
4.2. Análisis estructural mediante microscopía confocal láser de barrido	64
4.3. Estudio de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima de erradicación de biopelículas de MNPCR frente a diferentes antimicrobianos.	67
4.3.1. Estudio de CMIs	67
4.3.2. Estudio de CMEBs	68
4.4. Estudio del efecto de antibióticos en la estructura de biopelículas de MNPCR mediante microscopía confocal láser de barrido	70

4.5. Estudio de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima de erradicación de biopelículas de MNPCR frente a diferentes agentes antibiopelícula y combinación de antibióticos y agentes antibiopelícula.	71
4.5.1. Estudio de CMIs	71
4.5.2. Estudio de CMEBs	71
4.6. Estudio del efecto de la combinación de antibióticos y agentes antibiopelícula en la estructura de biopelículas de MNPCR mediante microscopía confocal láser de barrido.....	72
5. RESULTADOS	75
5.1. Análisis estructural mediante microscopía confocal láser de barrido	77
5.1.1. Modelos ajustados.....	77
5.1.2. Análisis de espesores	79
5.1.3. Análisis del porcentaje de superficie cubierta	80
5.1.4. Análisis del porcentaje de autofluorescencia total	86
5.1.5. Análisis del porcentaje de bacterias muertas	89
5.2. Estudio de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima de erradicación de biopelículas de MNPCR frente a diferentes antimicrobianos.	90
5.3. Estudio del efecto de antibióticos en la estructura de biopelículas de MNPCR mediante microscopía confocal láser de barrido	91
5.3.1. Ciprofloxacino	91
5.3.2. Claritromicina	94
5.3.3. Amicacina.....	97
5.3.4. Tablas comparativas del efecto de los antibióticos ciprofloxacino, claritromicina y amicacina en la estructura de biopelículas de MNPCR	100

5.4. Estudio de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima de erradicación de biopelículas de MNPCR frente a diferentes agentes antibiopelícula y combinación de antibióticos y agentes antibiopelícula	101
5.5. Estudio del efecto de la combinación de antibióticos y agentes antibiopelícula en la estructura de biopelículas de MNPCR mediante microscopía confocal láser de barrido.....	103
5.5.1. Ciprofloxacino-Tween.....	103
5.5.2. Ciprofloxacino-NAC.....	106
5.5.3. Claritromicina-Tween	109
5.5.4. Claritromicina-NAC	112
5.5.5. Amicacina-Tween	115
5.5.6. Amicacina-NAC	118
5.5.7. Tablas comparativas del efecto de ciprofloxacino, ciprofloxacino-Tween y ciprofloxacino-NAC en la estructura de biopelículas de MNPCR	121
5.5.8. Tablas comparativas del efecto de claritromicina, claritromicina-Tween y claritromicina-NAC en la estructura de biopelículas de MNPCR.....	123
5.5.9. Tablas comparativas del efecto de amicacina, amicacina-Tween y amicacina-NAC en la estructura de biopelículas de MNPCR	125
6. DISCUSIÓN.....	127
6.1. Autofluorescencia en biopelículas de MNPCR	129
6.2. Estructura de biopelículas de MNPCR en relación con la especie	130
6.3. Sensibilidad y efecto de antibióticos en biopelículas de MNPCR	132
6.4. Efecto de antibióticos en combinación junto a agentes antibiopelícula en biopelículas de MNPCR.....	136

7. CONCLUSIONES.....	139
8. BIBLIOGRAFÍA.....	145
9. ANEXO: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS.....	169

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Foliculitis causada por <i>M. chelonae</i> (FJD, Madrid).	27
Figura 2. PCR MIN 33 para diferenciar <i>Mycobacterium chimaera</i> y <i>Mycobacterium intracellulare</i> . Biological Sciences. Virginia, EE.UU.	29
Figura 3. Representación esquemática de la envoltura celular micobacteriana.	30
Figura 4. Técnicas de tinción específicas de bacilos ácido-alcohol resistentes en muestras clínicas.	31
Figura 5. Sonda GenoType® <i>Mycobacterium</i> CM/AS.	31
Figura 6. Imagen radiológica de infección pulmonar por <i>M. intracellulare</i> (FJD, Madrid).	32
Figura 7. Biopelícula de <i>M. smegmatis</i> a las 24h (tinción Live/Dead BackLight®).	41
Figura 8. Formación de biopelículas de <i>M. avium</i> y <i>Methylobacterium spp.</i>	41
Figura 9. Proceso de formación de una biopelícula.	43
Figura 10. Formación de endosporas en <i>M. marinum</i>	48
Figura 11. Detalle de una placa hidrofóbica de 2x4 pocillos para visualización mediante CLSM.	64
Figura 12. Detalle de una placa MBEC™ <i>Biofilm Inoculator</i>	69
Figura 13. Espesor medio en biopelículas de MNPCR.	79
Figura 14. Biopelículas de <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. peregrinum</i> y <i>M. mageritense</i> (tinción Live/Dead BackLight®).	80
Figura 15. Biopelículas de <i>M. chelonae</i> , <i>M. smegmatis</i> y <i>M. mucogenicum</i> (tinción Live/Dead BackLight®).	81
Figura 16. Porcentaje medio de superficie cubierta en biopelículas de MNPCR.	81

Figura 17. Reconstrucción 3D de imágenes mediante CLSM (48h) (tinción Live/Dead Backlight®).....	82
Figura 18. Cordones de <i>M. abscessus</i> a las 24 h.....	83
Figura 19. Cordones de <i>M. chelonae</i> a las 72h y a las 96h.....	83
Figura 20. Cordones de <i>M. mucogenicum</i> a las 96h.....	83
Figura 21. Cordones de <i>M. smegmatis</i> a las 24 h.....	84
Figura 22. Superficie cubierta de <i>M. fortuitum</i> , <i>M. abscessus</i> y <i>M. peregrinum</i> mediante CLSM.	84
Figura 23. Superficie cubierta de <i>M. mageritense</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. smegmatis</i> y <i>M. chelonae</i> mediante CLSM.	85
Figura 24. Porcentaje medio de autofluorescencia en biopelículas de MNPCR.	86
Figura 25. Biopelícula de <i>M. fortuitum</i> a las 24h.....	86
Figura 26. Biopelícula de <i>M. smegmatis</i> tratada 72h con amicacina.....	87
Figura 27. Superposición de autofluorescencia y Nile Red® en biopelículas de <i>M. fortuitum</i> y <i>M. chelonae</i>	87
Figura 28. Autofluorescencia extracelular en biopelícula de <i>M. abscessus</i> a las 24h.....	88
Figura 29. Reconstrucción 3D: biopelícula de <i>M. fortuitum</i> (tinción Nile Red® y autofluorescencia).	88
Figura 30. Porcentaje medio de bacterias muertas en biopelículas de MNPCR.	89
Figura 31. Biopelícula de <i>M. mageritense</i> a las 24h (tinción Live/Dead BackLight®).	90
Figura 32. Efecto de ciprofloxacino en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.....	91
Figura 33. Efecto de claritromicina en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.....	94

Figura 34. Efecto de amicacina en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.....	97
Figura 35. Efecto de ciprofloxacino-Tween en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.....	103
Figura 36. Efecto de ciprofloxacino-NAC en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.....	106
Figura 37. Efecto de claritromicina-Tween en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.....	109
Figura 38. Efecto de claritromicina-NAC en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.....	112
Figura 39. Efecto de amicacina-Tween en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.	115
Figura 40. Efecto de amicacina-NAC en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.....	118
Figura 41. Cordones de <i>M.abscessus</i> en cabeza y cola del pez cebra mediante microscopía confocal.....	131
Figura 42. <i>M. chelonae</i> tras la exposición 72h con ciprofloxacino.....	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de micobacterias no tuberculosas según Timpe y Runyon.	21
Tabla 2. Enfermedades infecciosas y localización geográfica de micobacterias atípicas comúnmente aisladas en la práctica clínica.	24
Tabla 3. Criterios clínicos y microbiológicos para el diagnóstico de enfermedad pulmonar por MNT.....	34
Tabla 4. Lista de algunas infecciones humanas en las que están involucradas biopelículas bacterianas.....	45
Tabla 5. Cepas ATCC de MNPCR empleadas en el estudio (FJD, Madrid).	63
Tabla 6. Datos de los espectros de excitación y emisión empleados en el CLSM.....	65
Tabla 7. Valores de referencia del CLSI para la interpretación de CMI's en MCR.....	70
Tabla 8. Resumen del modelo ajustado estadístico para la autofluorescencia.....	77
Tabla 9. Resumen del modelo ajustado estadístico para el porcentaje de superficie cubierta.....	78
Tabla 10. Resumen del modelo ajustado estadístico para el porcentaje de bacterias muertas.....	78
Tabla 11. Resumen del modelo ajustado estadístico para el espesor.	79
Tabla 12. Valores de CMI y CMEB para las diferentes especies de MNPCR y los antibióticos ciprofloxacino (CIP), claritromicina (CLR) y amicacina (AN)..	90
Tabla 13. Valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a ciprofloxacino según el test Mann-Whitney.....	92
Tabla 14. Espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a ciprofloxacino.	93
Tabla 15. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a ciprofloxacino.....	93

Tabla 16. Valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a claritromicina según el test Mann-Whitney.	95
Tabla 17. Espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a claritromicina.....	96
Tabla 18. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a claritromicina.	96
Tabla 19. Valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a amicacina según el test Mann-Whitney.	98
Tabla 20. Espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a amicacina.....	99
Tabla 21. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a amicacina.	99
Tabla 22. Valores p obtenidos tras comparar el espesor y % de bacterias muertas de MNPCR entre amicacina (AN), ciprofloxacino (CIP) y claritromicina (CLR) según el test Mann-Whitney.....	100
Tabla 23. Valores p obtenidos tras comparar el % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR entre amicacina (AN), ciprofloxacino (CIP) y claritromicina (CLR) según el test Mann-Whitney.....	101
Tabla 24. Valores de CMI de agentes antibiopelícula (NAC y Tween 80) en MNPCR.	101
Tabla 25. Valores de CMEB de combinaciones de agentes antibiopelícula (NAC y Tween 80) con ciprofloxacino (CIP), claritromicina (CLR) y amicacina (AN) en MNPCR.	102
Tabla 26. Valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a ciprofloxacino-Tween según el test Mann-Whitney.	104
Tabla 27. Espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a ciprofloxacino-Tween.....	105
Tabla 28. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a ciprofloxacino-Tween.....	105

Tabla 29. Valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a ciprofloxacino-NAC según el test Mann-Whitney.	107
Tabla 30. Espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a ciprofloxacino-NAC.....	108
Tabla 31. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a ciprofloxacino-NAC.	108
Tabla 32. Valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a claritromicina-Tween según el test Mann-Whitney.	110
Tabla 33. Espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a claritromicina-Tween.....	111
Tabla 34. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a claritromicina-Tween.....	111
Tabla 35. Valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a claritromicina-NAC según el test Mann-Whitney.	113
Tabla 36. Espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a claritromicina-NAC.....	114
Tabla 37. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a claritromicina-NAC.	114
Tabla 38. Valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a amicacina-Tween según el test no Mann-Whitney.	116
Tabla 39. Espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a amicacina-Tween.....	117
Tabla 40. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a amicacina-Tween.....	117
Tabla 41. Valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a amicacina-NAC según el test Mann-Whitney.	119
Tabla 42. Espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a amicacina-NAC.	120

Tabla 43. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a amicacina-NAC.	120
Tabla 44. Valores <i>p</i> obtenidos tras comparar el espesor y % de bacterias muertas de MNPCR entre ciprofloxacino (CIP), CIP+Tween y CIP+NAC según el test Mann-Whitney.	121
Tabla 45. Valores <i>p</i> obtenidos tras comparar el % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR entre ciprofloxacino (CIP), CIP+Tween y CIP+NAC según el test Mann-Whitney.	122
Tabla 46. Valores <i>p</i> obtenidos tras comparar el espesor y % de bacterias muertas de MNPCR entre claritromicina (CLR), CLR+Tween y CLR+NAC según el test Mann-Whitney.....	123
Tabla 47. Valores <i>p</i> obtenidos tras comparar el % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR entre claritromicina (CLR), CLR+Tween y CLR+NAC según el test Mann-Whitney.	124
Tabla 48. Valores <i>p</i> obtenidos tras comparar el espesor y % de bacterias muertas de MNPCR entre amicacina (AN), AN+Tween y AN+NAC según el test Mann-Whitney.	125
Tabla 49. Valores <i>p</i> obtenidos tras comparar el % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR entre amicacina (AN), AN+Tween y AN+NAC según el test Mann-Whitney.....	126

ÍNDICE DE FÓRMULAS

Fórmula 1. Cálculo de la variable autofluorescencia.	66
Fórmula 2. Cálculo de la variable superficie cubierta.	66
Fórmula 3. Cálculo del porcentaje de bacterias muertas.	66
Fórmula 4. Cálculo de la variable espesor.	66

GLOSARIO DE TÉRMINOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AN: Amicacina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

ATS/IDSA: *American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America*

CBD: *Calgary Biofilm Device*

CIP: Ciprofloxacino

CLR: Claritromicina

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CLSM: Microscopio confocal láser de barrido (*Confocal Laser Scanning Microscopy*)

CMEB: Concentración Mínima de Erradicación de la Biopelícula

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

Genes *erm*: Genes determinantes de resistencia a los macrólidos (*erythromycin ribosome methylation*)

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

GPL: Glicopeptidolípido

MAC: Complejo *Mycobacterium avium*

McF: MacFarland

MCR: Micobacterias de crecimiento rápido

MH-II: Caldo Mueller-Hinton II

MNPCR: Micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido

MNT: Micobacterias no tuberculosas

NAC: N-Acetilcisteína

PBS: Tampón fosfato salino (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

QS: *Quorum sensing*

7H9: Medio líquido Middlebrook 7H9

7H10: Placas de agar Middlebrook 7H10

RESUMEN EN ESPAÑOL

1. Introducción

Las infecciones producidas por micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido (MNPCR) se han visto incrementadas en los últimos años, especialmente debido a la gran ubicuidad en la naturaleza de dichos microorganismos¹ (particularmente en suelo húmedo, pantanos, arroyos, ríos y estuarios), a su alta resistencia a antibióticos y desinfectantes²⁻³, al empleo de medicinas alternativas⁴ y a su capacidad de formar biopelículas⁵.

Pueden causar un amplio espectro de infecciones en humanos, incluyendo infección del tracto respiratorio⁶, infección de piel y tejidos blandos⁷, o infección asociada a la presencia de cuerpos extraños⁸. Entre los patógenos humanos habituales responsables de dichas infecciones se encuentran *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* y *Mycobacterium fortuitum*⁹, los cuales están distribuidos ampliamente por todo el mundo y llegan a representar aproximadamente el 90% de las infecciones por micobacterias de crecimiento rápido¹⁰. Otras especies de MNPCR se aíslan con menor frecuencia y solo en algunos casos excepcionales pueden ser consideradas como la causa de la infección¹¹, como *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium peregrinum* o *Mycobacterium smegmatis*.

Como herramientas diagnósticas se incluyen la observación microscópica directa, el cultivo y técnicas fenotípicas, bioquímicas, cromatográficas y moleculares. La autofluorescencia también se puede usar con éxito para diferenciar levaduras y bacterias. Esta propiedad no es intrínseca a todos los microorganismos aunque sí ha sido observada previamente en *M. fortuitum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. smegmatis* y *Mycobacterium marinum*, y especies relacionadas como *Nocardia sp.* y *Corynebacterium glutamicum*¹².

La resistencia tan elevada a antibióticos y desinfectantes asociada a estos microorganismos viene dada en su mayor parte a la composición altamente rica en lípidos de su envoltura celular, que dificulta la entrada de estos compuestos en la célula bacteriana, al desarrollo de resistencias fenotípicas secundarias a mutaciones específicas, como por ejemplo los genes *erm*¹³, y a la capacidad de estos microorganismos de formar biopelículas. Debido a ello, el tratamiento de este tipo de infecciones se debe realizar con combinaciones de fármacos

durante períodos de tiempo prolongados o incluso con tratamiento quirúrgico¹⁴. En el tratamiento de infecciones causadas por MNPCR se emplean preferentemente los macrólidos, las quinolonas y amicacina. No existen estudios en relación con el uso de agentes antibiopelícula en biopelículas formadas por micobacterias, aunque un estudio previo realizado por J.O. Falkinham, III puso de manifiesto que Tween a bajas concentraciones reduce la agregación bacteriana y aumenta la sensibilidad de las células a agentes antimicrobianos¹⁵.

2. Objetivos

1. Estudiar las características fenotípicas de las biopelículas formadas por MNPCR (velocidad de crecimiento, superficie cubierta, porcentaje de bacterias vivas/muertas y autofluorescencia) mediante microscopía confocal láser de barrido (CLSM).
2. Estudiar la sensibilidad *in vitro* de MNPCR frente a amicacina, ciprofloxacino y claritromicina en células planctónicas y en biopelículas, mediante estudios de concentración mínima inhibitoria (CMI) y estudios de concentración mínima de erradicación de biopelícula (CMEB), y su efecto en las características fenotípicas de las biopelículas mediante CLSM.
3. Estudiar la sensibilidad *in vitro* de MNPCR frente a Tween 80 y N-acetilcisteína (NAC) solos y en combinación de amicacina, ciprofloxacino y claritromicina en células planctónicas y en biopelículas mediante CMI y CMEB, y su efecto en las características fenotípicas de las biopelículas mediante CLSM.

3. Materiales y métodos

I. Cepas de colección

Se utilizaron siete cepas tipo de MNPCR: *M. abscessus* DSM 44196, *M. chelonae* ATCC 19235, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. mageritense* ATCC 700351, *M. mucogenicum* DSM 44124, *M. peregrinum* ATCC 14467 y *M. smegmatis* ATCC 607.

II. Determinación de características fenotípicas

- Microscopía

El crecimiento de las biopelículas de MNPCR en estudio se desarrolló en placas sin recubrimiento e hidrofóbicas de 2x4 pocillos (ibidy GMBH, Martinsried, Alemania). El análisis estructural de las mismas se realizó mediante un microscopio confocal láser de barrido Leica DM IRB (Leica, Alemania) con el objetivo de inmersión HCX PL APO lambda blue 63,0 x 1,40 OIL UV, empleando tres láseres de excitación diferentes (Diode 405, HeNe 543 y Argon 488) en función del parámetro a estudiar (espesor, superficie cubierta, porcentaje de bacterias vivas/muertas y autofluorescencia) y dos tinciones fluorescentes: la tinción Nile Red[®] (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) y Live/Dead BackLight[®] (Invitrogen, Estados Unidos). El estudio se llevó a cabo por triplicado y a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96h). Las fotografías obtenidas se analizaron con el software Image J (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, Estados Unidos).

- Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó mediante el test estadístico ANOVA ($p < 0,05$; estadísticamente significativo) y utilizando la librería NLME (*Linear and nonlinear mixed effects models*) implementada en el paquete estadístico R¹⁶.

III. Estudios de sensibilidad en las *Bacteria* planctónicas y contenidas en biopelículas

Se hicieron estudios de sensibilidad antibiótica frente a ciprofloxacino, amicacina y claritromicina (Sigma, Alemania) solos y en combinación de los agentes antibiopelícula Tween 80 (BD, Estados Unidos) y NAC (Sigma, Alemania) frente a células en estado planctónico (CMI) y en biopelícula (CMEB). Para los estudios de CMI se siguió la técnica estandarizada de microdilución en caldo indicada por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)¹⁷, y para los estudios de CMEB el protocolo basado en el sistema de Calgary¹⁸ usando las placas de 96 pocillos MBEC[™] *Biofilm Inoculator* (Innovotech, Canadá).

Adicionalmente, se analizó el efecto de los antibióticos y agentes antibiopelícula en los parámetros fenotípicos de biopelículas preformadas de *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. smegmatis* mediante CLSM.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

- Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante el test de Mann-Whitney/Wilcoxon ($p < 0,05$; estadísticamente significativo) empleando la versión 3.5.1. del programa EPI-INFO (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA).

4. Resultados

Mediante microscopía confocal láser de barrido detectamos la presencia de autofluorescencia azul en todas las cepas estudiadas, dentro de las células micobacterianas y en la matriz extracelular. Además, visualizamos la presencia de cordones en *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. mucogenicum* y *M. smegmatis*, y observamos un porcentaje mayor de superficie cubierta en *M. fortuitum* y *M. abscessus*.

Hemos visto cómo las micobacterias en biopelícula se hacen hasta $>10^6$ veces más resistentes que cuando están en estado planctónico. Al adicionar antibióticos, el espesor es el parámetro más afectado, y ciprofloxacino ha demostrado ser el antibiótico más activo frente a este tipo de biopelículas.

NAC y Tween 80 al combinarlos con antibióticos ejercen un efecto sinérgico en el incremento del porcentaje de bacterias muertas, y en la reducción de la superficie cubierta y espesor de las biopelículas de micobacterias de crecimiento rápido. Sin embargo, Tween 80 demuestra ser un agente antibiopelícula más eficaz que NAC al reducir la superficie cubierta y el espesor en mayor medida que éste.

5. Discusión

La autofluorescencia azul específica de las MNPCR estudiadas puede estar en relación con la secreción de las coenzimas F₄₂₀ o FO por los componentes bacterianos de la biopelícula¹² y, de esta forma, detectarse en la matriz extracelular en forma de autofluorescencia. Otra posibilidad es que esta molécula se libere después de la muerte celular durante la formación de la biopelícula o que fuese un factor *quorum sensing* desconocido, al detectarse preferentemente en las primeras etapas de la formación de la biopelícula.

La estructura y disposición que presentan las biopelículas de micobacterias va íntimamente ligado a su capacidad patógena, como también han estudiado otros equipos investigadores incluyendo Bernut *et al.* y Williams *et al.*¹⁹⁻²⁰. En este trabajo hemos observado esta relación en el caso de *M. fortuitum* y *M. abscessus*, donde el porcentaje de superficie cubierta es más elevado, o la presencia de cordones en *M. abscessus* y *M. chelonae*.

Las micobacterias cuando forman parte de una biopelícula llegan a alcanzar recuentos de hasta 100.000 UFC/cm², como bien describe J.O. Falkinham, III¹⁵, y ven incrementada su resistencia a antibióticos y desinfectantes debido, en parte, a la velocidad de crecimiento de las mismas, hidrofobicidad e impermeabilidad²¹. Esto hace increíblemente difícil su tratamiento y, en muchos casos, se requieren tratamientos muy largos e incluso tratamientos quirúrgicos. Tras la observación de los resultados de sensibilidad comparativos de CMI y CMEB, ciprofloxacino ha demostrado ser un potente antibiótico en este tipo de biopelículas y el mecanismo de acción del mismo podría estar ligado a su eficacia, al inhibir la síntesis de ADN y ser bactericida, ejerciendo así una acción terapéutica irreversible. Por otro lado, las combinaciones antibióticas con 0,5% de Tween 80 reducen el porcentaje de superficie cubierta y el espesor de las biopelículas de MNPCR en estudio en mayor medida que el agente mucolítico NAC, pudiendo encontrar explicación en la acción que ejerce dicho desinfectante en los lípidos de la envoltura celular micobacteriana, composición fundamental de las mismas.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que cada una de las MNPCR estudiadas presenta una distribución y comportamiento en biopelícula diferente, pero con características comunes, que nos pueden ayudar a orientar mejor el tratamiento frente a micobacterias de crecimiento rápido. Los parámetros fenotípicos (espesor, superficie cubierta, autofluorescencia, porcentaje de bacterias vivas/muertas) se ven afectados al adicionar antibióticos y agentes antibiopelícula, siendo el parámetro espesor el más afectado, y ciprofloxacino el antibiótico más efectivo frente a biopelículas. Tween 80, a baja concentración y en combinación con antibióticos, es un potente agente antibiopelícula con resultados prometedores *in vitro*, lo que daría pie a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

ENGLISH SUMMARY

1. Introduction

Infections caused by *non-pigmented rapidly growing mycobacteria* (NPRGM) have increased in recent years, especially due to the ubiquitous nature of these microorganisms¹ (particularly in moist soils, marshes, streams, rivers and estuaries), to its high resistance to antibiotics and disinfectants²⁻³, the use of alternative medicines⁴ and their ability to form biofilms⁵.

They can cause a wide spectrum of human infections, including respiratory tract infections⁶, skin and soft tissue infections⁷, or foreign body associated infections⁸. Some common human pathogens responsible for these infections are *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium fortuitum*⁹, which are widely distributed throughout the world and represent about the 90% of rapidly growing mycobacteria infections¹⁰. Other NPRGM species are less frequently isolated and only in exceptional cases may be considered as the cause of infection¹¹, such as *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium peregrinum* or *Mycobacterium smegmatis*.

Direct microscopic observation, cultivation, and phenotypic, biochemical and molecular chromatographic techniques are diagnostic tools. Autofluorescence may be also successfully used for differentiating yeast and bacteria. This property is not intrinsic to all organisms although it has been previously observed in *M. fortuitum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. smegmatis* and *Mycobacterium marinum*, and in related species such as *Nocardia sp.* and *Corynebacterium glutamicum*¹².

The high resistance to antibiotics and disinfectants associated with these organisms is mainly attributed to the high mycolic acid content of their cell envelope, which hinders the entry of these compounds into the bacterial cell, the development of phenotypic resistance secondary to specific mutations such as the gene *erm*¹³ and the ability of these microorganisms to form biofilms. As a result, the treatment of these infections should be performed with combinations of drugs over long periods of time or even with surgical treatment¹⁴. Usually macrolides, quinolones and amikacin are used in the treatment of infections caused by NPRGM. There are no studies regarding the use of antibiofilm agents in biofilms formed by mycobacteria, although a previous study by JO Falkinham, III showed that Tween at low

concentrations reduces the bacterial aggregation and increases the susceptibility of cells to antimicrobial agents¹⁵.

2. Objectives

1. To study the phenotypic characteristics of biofilms formed by NPRGM (growth rate, percentage of covered surface, percentage of live/dead bacteria and autofluorescence) by *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM).
2. To study the *in vitro* susceptibility of NPRGM to amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin on planktonic cells and biofilms through studies of *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) and *Minimum Biofilm Eradication Concentration* (MBEC), and its effect on the phenotypic characteristics in biofilms by CLSM.
3. To study the *in vitro* susceptibility of NPRGM to Tween 80 and N-acetylcysteine (NAC) alone and in combination of amikacin, ciprofloxacin and clarithromycin on biofilm and planktonic cells by MIC and MBEC, and its effect on the phenotypic characteristics of biofilms by CLSM.

3. Materials and Methods

I. Strains collection

Seven strains of NPRGM were used: *M. abscessus* DSM 44196, *M. chelonae* ATCC 19235, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. mageritense* ATCC 700351, *M. mucogenicum* DSM 44124, *M. peregrinum* ATCC 14467 and *M. smegmatis* ATCC 607.

II. Phenotypic characteristics determination

- Microscopy

The growth of the NPRGM biofilms in the study was conducted in uncoated and hydrophobic plates with 2x4 wells (ibidy GMBH, Martinsried, Germany). The structural analysis was performed using a confocal laser scanning microscopy Leica DM IRB (Leica, Germany) with the

HCX PL APO lambda blue 63.0 x 1.40 OIL UV immersion objective, using three different kinds of excitation lasers (Diode 405, HeNe 543 and Argon 488) depending on the parameter studied (thickness, covered surface, percentage of live/dead bacteria and autofluorescence) and two fluorescent dyes: Nile Red staining[®] (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) and Live/Dead BackLight staining[®] (Invitrogen, USA). The study was performed in triplicate and at different times (24, 48, 72 and 96 hours). The photographs were analyzed with Image J software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

- Statistical Analysis

The analysis of the results was performed using the ANOVA statistical test ($p < 0.05$; statistically significant) and using the NLME library (*Linear and nonlinear mixed effects models*) implemented in the statistical package R¹⁶.

III. Susceptibility studies on planktonic *Bacteria* and biofilms contained

Susceptibility studies were performed in ciprofloxacin, amikacin and clarithromycin (Sigma, Germany) alone and in combination with the antibiofilm agents Tween 80 (BD, USA) and NAC (Sigma, Germany) to planktonic cells (MIC) and biofilms (MBEC). To study the MIC we followed the standardized microdilution technique indicated by the *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)¹⁷, and for studies of MBEC, the Calgary-based protocol system¹⁸ using the 96-well plates MBEC[™] *Biofilm Inoculator* (Innovotech, Canada). Additionally, the effect of antibiotics and antibiofilm agents in the phenotypic parameters was analyzed in the preformed biofilms of *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* and *M. smegmatis* by CLSM. All experiments were performed in triplicate.

- Statistical Analysis

The results were analyzed using the Mann-Whitney/Wilcoxon test ($p < 0.05$; statistically significant) using the EPI-INFO version 3.5.1. (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA).

4. Results

We detected by confocal laser scanning microscopy the presence of blue autofluorescence, within the mycobacterial cells and in the extracellular matrix, in all the strains studied. In addition, we visualized the presence of cords in *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. mucogenicum* and *M. smegmatis*, and observed a higher percentage of covered surface in *M. fortuitum* and *M. abscessus*.

We have seen how mycobacteria in biofilm become $>10^6$ times more resistant than those in a planktonic state. By adding antibiotics, thickness is the most affected parameter, and ciprofloxacin appears to be the most active antibiotic against this type of biofilm.

NAC and Tween 80 combined with antibiotics exert a synergistic effect in increasing the percentage of dead bacteria, and reducing the thickness and covered surface of the rapidly growing mycobacteria biofilms. However, Tween 80 proves to be a more effective antibiofilm agent than NAC, especially reducing the covered surface and thickness.

5. Discussion

The specific blue autofluorescence from the NPRGM studied can be related to the secretion of F420 or FO coenzymes by bacterial components of the biofilm¹² and, thus, detected in the extracellular matrix as autofluorescence. Another possibility is that this molecule was released after cell death during biofilm formation or that it was an unknown *quorum sensing* factor detected primarily in the early stages of the biofilm formation.

The structure and arrangement of mycobacterial biofilms is closely linked to their pathogenicity, a characteristic that has been studied by other researchers such as Bernut *et al.* and Williams *et al.*¹⁹⁻²⁰. In this work we observed this link in *M. fortuitum* and *M. abscessus*, where the percentage of covered surface is higher, or the presence of cords in the morphology of *M. abscessus* and *M. chelonae*.

Mycobacteria in biofilms can reach up to 100,000 CFU/cm², being well described by J.O. Falkinham, III¹⁵, and they show an increase in their resistance to antibiotics and disinfectants due in part to their growth speed, hydrophobicity and impermeability²¹. This makes their treatment incredibly difficult and, in many cases, long lasting and even surgical treatments are required. Upon observation of the susceptibility results of MICs and MBECs, ciprofloxacin has proven to be a potent antibiotic in micobacterial biofilms. Its mechanism of action may be linked to its effectiveness, by inhibition the synthesis of DNA and its bactericidal activity, it can exert an irreversible therapeutic action. On the other hand, antibiotic combinations with 0.5% of Tween 80 reduced the percentage of covered surface and thickness of the NPRGM biofilms studied further than the mucolytic agent NAC. This fact could be due to the action exerted by this disinfectant in the lipid composition of the mycobacterial cell envelope.

6. Conclusion

The results obtained in this work show that each of the NPRGM studied presents a different distribution and behavior in biofilms, but there are common features that can lead to better therapy against rapidly growing mycobacteria. Phenotypic parameters (thickness, covered surface, autofluorescence, percentage of live/dead bacteria) are affected by adding antibiotics and antibiofilm agents, the thickness being the most affected parameter, and ciprofloxacin the most effective antibiotic against micobacterial biofilms. Tween 80, at a low concentration and in combination with antibiotics, is a potent antibiofilm agent with promising *in vitro* results, which would lead to the development of new therapeutic strategies.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El género *Mycobacterium*

En 1882 Robert Koch describió por primera vez las características de las bacterias causantes de la tuberculosis, siendo más tarde definido el género *Mycobacterium* por Lehmann y Neumann en 1896²². Muchas nuevas especies han sido descritas desde entonces, existiendo actualmente dentro del género *Mycobacterium*, a fecha de 10 de Octubre de 2014, ciento sesenta y nueve especies y trece subespecies bien caracterizadas²². Esto se debe principalmente al desarrollo de herramientas genéticas, que proporcionan una mayor precisión a la hora de clasificar a las especies bacterianas en función de su taxonomía²³⁻²⁶.

A excepción del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*, definidos como patógenos primarios, el resto de micobacterias se consideran microorganismos ambientales que pueden ser patógenos potenciales²⁷. Pueden producir una gran variedad de síndromes clínicos no sólo en pacientes inmunodeprimidos sino también en individuos inmunocompetentes, destacando infecciones pulmonares crónicas, linfadenitis superficial, infección osteoarticular y de tejidos blandos e infección diseminada^{8, 28-29}. Los pacientes con algún factor de riesgo o con alguna enfermedad de base son más vulnerables a este tipo de infecciones²⁹.

A este grupo amplio de micobacterias se le conoce por los términos "atípicas", "ambientales", "oportunistas ambientales" o por el término de "micobacterias no tuberculosas" (MNT)³⁰⁻³². De igual forma, las enfermedades causadas por las mismas se engloban dentro de los términos micobacteriosis, infecciones por micobacterias no tuberculosas o micobacteriosis atípicas.

Las infecciones por MNT se han constituido en un fenómeno emergente, principalmente en la última década²⁹. Debido a los programas de prevención y control estrictos que existen, en particular para *M. tuberculosis*, en países industrializados como Estados Unidos y Canadá se está viendo un aumento de la prevalencia de especies de MNT en entornos clínicos en relación con el número de casos de tuberculosis³³⁻³⁴. Estos microorganismos destacan por su ubicuidad en la naturaleza y por su resistencia a múltiples desinfectantes y antibióticos^{2-3, 35-39}. Se presentan por lo general en pacientes inmunodeprimidos y pacientes con VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana), leucemia o que reciben quimioterapia³². Sin embargo,

recientemente se han descrito brotes en pacientes inmunocompetentes relacionados con procedimientos estéticos del tipo de la mesoterapia^{4, 40-41}, y otros casos asociados a tatuajes y acupuntura⁴²⁻⁴⁵ u operaciones de cirugía estética⁴⁶, más aún si éstos han sido realizados en centros no autorizados ni supervisados por las autoridades sanitarias, o sin las debidas medidas de asepsia⁴⁷⁻⁴⁸.

1.2. Micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido

1.2.1. Definición

Se incluyen en el concepto de MNT o micobacterias atípicas a aquellos agentes bacterianos ácido-alcohol resistentes, en su mayoría saprófitos, diferentes de los que causan tuberculosis o lepra, y que se diferencian en el hábitat, las necesidades de crecimiento y las capacidades metabólicas¹⁵. Estas micobacterias atípicas se pueden aislar en casi todos los hábitats, y pueden ocasionar infección en el humano (micobacterias oportunistas)^{15, 49}.

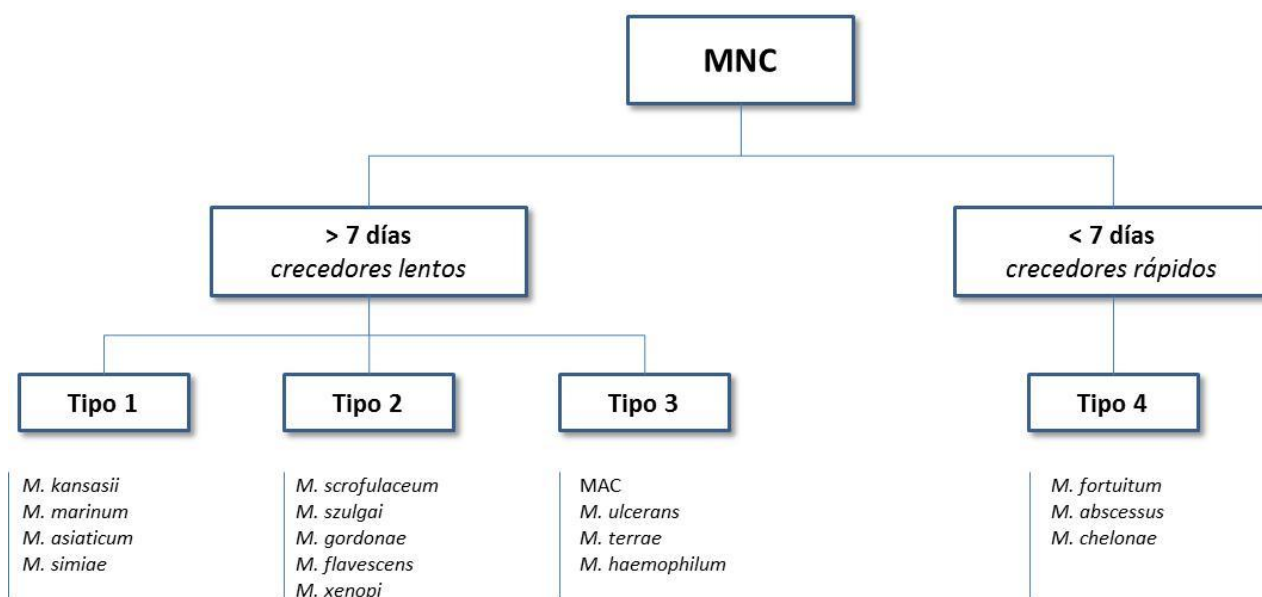
1.2.2. Clasificación

La clasificación de las MNT se basa en función de la velocidad de crecimiento y de la producción o no de pigmento, de acuerdo al sistema de Timpe y Runyon⁵⁰ (Tabla 1).

- Runyon I: Fotocromógenos: son de crecimiento lento y producen un pigmento amarillo-anaranjado cuando se exponen a la luz. Ej. *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium asiaticum*, *Mycobacterium simiae*.
- Runyon II: Escotocromógenos: son de crecimiento lento y producen un pigmento amarillo-anaranjado en la luz o en la oscuridad. Algunas se oscurecen con la exposición a la luz. Ej. *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium flavescens*.
- Runyon III : No cromogénicos: son organismos de crecimiento lento que no producen el pigmento. Ej. Complejo *Mycobacterium avium* (MAC), *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium shimoidei*, *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium haemophilum*.

- Runyon IV: Crecimiento rápido: micobacterias con un crecimiento <7 días, pero más lento que el de la mayoría de las bacterias. Ej. *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium thermoresistibile*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium smegmatis*.

Tabla 1. Clasificación de micobacterias no tuberculosas según Timpe y Runyon.



El grupo de micobacterias de crecimiento rápido (MCR) incluye diferentes especies con características fenotípicas similares y con una velocidad de crecimiento de entre 3-7 días, según el sistema de Timpe y Runyon. Debido a unas mejores técnicas de diagnóstico e identificación a nivel molecular, el número de especies englobadas en este grupo se ha visto incrementado, especialmente en los últimos años, englobando a más de 50 especies diferentes, de las que más de un tercio se han relacionado con infección en humanos^{8, 26, 51}. Las micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido (MNPCR) son los principales patógenos humanos dentro de este grupo y las que con mayor frecuencia se aíslan en los laboratorios clínicos⁵²⁻⁵³.

1.3. Epidemiología

Las micobacterias atípicas se multiplican en una gran variedad de fuentes naturales⁵⁴, y se aíslan muy frecuentemente en animales (ganado bovino y porcino, peces, monos y aves)⁵⁴⁻⁵⁸ y en el medio ambiente^{1, 23, 59-61}. Estas micobacterias pueden sobrevivir en duras condiciones ambientales, tales como un pH bajo, temperaturas extremas y bajas concentraciones de nutrientes^{10, 62}, y son relativamente resistentes a los desinfectantes clorados^{37, 63-64}, organomercuriales y al glutaraldehído^{10, 39, 65-66}. Por ello se asume que el medio ambiente puede ser una fuente potencial de infección cuando las condiciones son favorables^{1, 67}. Por ejemplo, *M. marinum* se encuentra principalmente en agua marina o lagos, siendo la causa más común de úlceras cutáneas de los pescadores y cuidadores de acuarios⁶⁸⁻⁶⁹.

Muchas especies de MNT son reconocidas como patógenos oportunistas pero muchas de ellas no se han asociado a patología en humanos²³. Existe un amplio espectro de virulencia dentro de las MNT, desde patógenos como *M. kansasii* que puede causar enfermedad en individuos presuntamente sanos, hasta *M. avium* que se asocia a individuos con enfermedad pulmonar preexistente o defectos en la inmunidad celular, e incluso *M. gordonae* que raramente produce infección en humanos²³. Durante las últimas 3 décadas se ha observado un notable incremento de las infecciones causadas por MNT, tanto localizadas como diseminadas, así como de los brotes nosocomiales por contaminación de equipos médicos^{10, 70}.

Los sistemas de distribución de agua potable contienen una diversa comunidad microbiana de bacterias, protozoos y hongos⁷¹⁻⁷⁵. En estas comunidades se incluyen a varios géneros que contienen patógenos oportunistas: *Sphingomonas* y *Methylobacterium* (α -Proteobacteria), *Burkholderia* y *Ralstonia* (β -Proteobacteria), *Legionella*, *Pseudomonas*, y *Stenotrophomonas* (γ -Proteobacteria) y micobacterias no tuberculosas (MNT, *Actinobacteria*)^{73, 76-80}.

Joseph O. Falkinham, III y asociados de la Universidad Politécnica de Virginia han realizado numerosos y variados estudios epidemiológicos de MNT. Estos autores han encontrado este tipo de micobacterias en pantanos costeros, arroyos adyacentes y bosques, especialmente en aquellos ricos en turba, un material orgánico, de color pardo oscuro y rico en carbono⁸¹⁻⁸³. La mayoría de MNT son, de hecho, microorganismos ambientales que se encuentran en los sistemas de distribución de agua potable^{27, 84-85} y en las cañerías de las casas^{5, 27}, y en este entorno se encuentran formando parte de biopelículas^{62, 76, 86-89}.

La superficie hidrofóbica de las micobacterias favorece la adhesión²¹ y la formación de biopelículas^{77, 90-91}. De igual forma, los materiales con una superficie más irregular, áspera e hidrofóbica tienen más tendencia al desarrollo de biopelículas⁹²⁻⁹³. Su capacidad de formar biopelículas es una estrategia de supervivencia frecuente que dificulta su erradicación⁶⁵, y la dispersión de estas biopelículas puede constituir un importante mecanismo de infección⁹⁴. Feazel *et al.* y Falkinham *et al.* han demostrado la existencia de una elevada concentración de MNT en biopelículas tomadas del sistema de conducción de agua en duchas⁹⁵⁻⁹⁶ y, aunque los riesgos de salud asociados no han sido dilucidados, muchos autores sugieren que personas con inmunosupresión o afectación pulmonar pueden tener un mayor riesgo de infección por MNT en estos casos^{78, 95}.

Los mecanismos de transmisión suelen ser a través de las vías respiratoria y digestiva⁹⁴, mediante la inhalación de aerosoles⁹⁵ o partículas de polvo⁹⁷, o mediante la ingesta de agua o de alimentos contaminados²⁵. Puede darse también por inoculación directa en el caso de la piel tras un traumatismo accidental, cirugía o inyección^{10, 98}, o puede existir diseminación hematógena a partir de un foco visceral. En los pacientes con SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida), la adquisición de *M. avium* es más probable a través del tracto gastrointestinal⁹⁹.

El hombre no es un reservorio importante de MNT, por lo que la transmisión persona a persona es extremadamente rara y no existen casos documentados al respecto^{9, 23-25, 32}. Salvo en el caso de brotes epidémicos con un foco común, no se ha objetivado la transmisión interhumanos salvo en muy pocas ocasiones (fibrosis quística)¹⁰⁰. Así, la infección producida por micobacterias atípicas está condicionada principalmente a la situación inmunológica del huésped³¹.

Actualmente, las enfermedades producidas por micobacterias atípicas no son de declaración obligatoria, con lo que las cifras de incidencia o prevalencia son puramente orientativas⁷. En general, se considera que existe una mayor incidencia en climas cálidos, siendo comunes en regiones tropicales y subtropicales⁷. Existen asimismo diferencias geográficas en la distribución de estas especies¹⁰¹⁻¹⁰² (Tabla 2).

Tabla 2. Enfermedades infecciosas y localización geográfica de micobacterias atípicas comúnmente aisladas en la práctica clínica¹⁰³.

Enfermedades infecciosa	Etiología	Localización geográfica
Enfermedad pulmonar	<i>M. avium complex</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. malmoense</i>	Distribución mundial EE.UU., Europa, minerías de carbón Distribución mundial aunque mayoritariamente EE.UU. Europa, Canadá Reino Unido, Norte de Europa
Linfadenitis	<i>M. avium complex</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. malmoense</i>	Distribución mundial Distribución mundial Reino Unido, Norte de Europa (especialmente Escandinavia)
Enfermedad cutánea	<i>M. marinum</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i> <i>M. ulcerans</i>	Distribución mundial Distribución mundial aunque mayoritariamente EE.UU. Distribución mundial aunque mayoritariamente EE.UU. Distribución mundial aunque mayoritariamente EE.UU. Australia, Trópicos, África, Sudeste asiático
Enfermedad diseminada	<i>M. avium complex</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. haemophilum</i>	Distribución mundial EE.UU. EE.UU. EE.UU., Australia

1.4. Patología humana

Las MNPCR pueden causar un amplísimo espectro de infecciones en humanos⁹⁸, tales como queratitis, endoftalmitis, artritis supurativa, osteomielitis, endocarditis, linfadenitis, infección urinaria crónica, otitis media, mastoiditis y pleuritis¹⁰⁴⁻¹¹².

Muchas de ellas, además, están relacionadas con la presencia de cuerpos extraños: catéteres^{8, 113-114}, válvulas cardíacas¹¹⁵, prótesis osteoarticulares¹¹⁶, prótesis mamarias^{46, 117} o infecciones de herida quirúrgica¹¹⁸. En otros casos se trata de infecciones crónicas que no responden al tratamiento convencional¹¹⁹.

Dentro de las MCR destacan principalmente como patógenos humanos *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. fortuitum*⁹, representando aproximadamente el 90% de las infecciones por MCR^{10-11, 120}. En concreto, *M. abscessus* ha sido recientemente reconocido como un patógeno emergente, en especial tras una cirugía o un proceso traumático, así como en pacientes con fibrosis quística^{10, 121-122}. Otros miembros de este grupo son aislados ambientales que raramente causan infección en humanos^{11, 123-124}. Por ejemplo, el aislamiento de *Mycobacterium mucogenicum* en cultivos respiratorios casi nunca es clínicamente significativo, ya que esta especie es frecuente en el agua del grifo y no suele causar enfermedades pulmonares³². Otras especies de MCR recientemente descritas como *Mycobacterium frederiksbergense*, *Mycobacterium hodleri*, y *Mycobacterium murale* han sido identificadas únicamente en muestras ambientales, no estando aún reconocidas como patógenos humanos²⁶.

La infección pulmonar causada por micobacterias atípicas es la manifestación más común¹²⁵, y tiene más prevalencia en personas con alguna patología pulmonar de base estructural²³, tales como pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tuberculosis, histoplasmosis, fibrosis quística u otras causas de bronquiectasias^{23, 32, 126}. Aunque las MNPCR están localizadas en todo el mundo, gran parte de la literatura sobre enfermedad pulmonar por MNT proviene de países industrializados, principalmente Europa, América del Norte y Japón¹²⁷. El complejo MAC, que engloba principalmente a *M. avium* y *M. intracellulare*, es la causa más común de enfermedad pulmonar en todo el mundo¹²⁸, siendo *M. abscessus* la etiología más prevalente dentro de las MNPCR³². Existen casos de infecciones mixtas por MNT asociadas con inmunosupresión celular en pacientes con VIH¹²⁹⁻¹³⁰, aunque la prevalencia real

puede estar subestimada debido a la dificultad existente a la hora de diferenciar morfológicamente las colonias en cultivos mixtos. Es probable que muchos casos de infección mixta por MNT se pierdan o se diagnostiquen erróneamente como infecciones por MNT causadas por un solo microorganismo, lo que resulta en la prescripción inapropiada de antibióticos. Un estudio retrospectivo reveló que el 29% de pacientes infectados por el complejo MAC están coinfectados por otras MNT, incluyendo *M. chelonae*, *M. simiae*, *M. fortuitum* y *M. abscessus*¹³¹. Del mismo modo, el 55% de los aislados con *M. abscessus* presentaron infección mixta por MAC o antecedentes de infección por este complejo¹³². Las infecciones mixtas por tres o más especies de MNT son más infrecuentes, aunque recientemente se ha publicado un caso de infección mixta pulmonar por tres especies diferentes de MNT: *M. kansasii*, MAC y *M. abscessus*¹³³.

Las infecciones diseminadas son casi siempre fatales y ocurren normalmente en personas con una profunda inmunosupresión celular (quimioterapia o trasplante de órganos)²³, y con el uso prolongado de catéteres⁸. En comparación con otras infecciones sanguíneas bacterianas, la tasa de mortalidad asociada con infecciones del torrente sanguíneo por MCR es generalmente baja^{32, 134-135}. Por lo general, las infecciones diseminadas por MCR se asocian con manifestaciones locales de infección, tales como eritema, calor, dolor, sensibilidad, supuración y síntomas sistémicos, como fiebre y escalofríos¹⁰.

En los años 80, en la era del virus VIH, la aparición de infecciones por MAC y MNT hizo aumentar la conciencia del sector médico respecto a este tipo de patógenos³². La enfermedad en pacientes inmunocompetentes por lo general se limita a lesiones localizadas de aspecto granulomatoso, aunque en pacientes con SIDA o inmunodeficientes puede haber manifestaciones muy diversas como infección pulmonar indistinguible de la tuberculosis^{24, 136}, linfadenitis o infección cutánea, e infección diseminada, con síntomas de pérdida de peso, fiebre, sudores nocturnos y anorexia²³.

En los últimos años se ha observado un incremento de infecciones causadas por MCR localizadas en piel y tejidos blandos, bien asociadas a intervenciones quirúrgicas de cirugía estética, o bien secundarias a infecciones diseminadas en pacientes inmunodeprimidos⁷. Esto se debe principalmente al uso de técnicas de medicina alternativa, y a que un número cada vez más elevado de procedimientos se realizan en centros quirúrgicos independientes, que no

son monitorizados rutinariamente por los organismos de supervisión equivalentes. Así, procedimientos de cirugía facial, abdominoplastias, liposucciones, mamoplastias y *piercings* se han asociado con infecciones debidas a MCR¹³⁷⁻¹³⁸, especialmente *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. chelonae*⁷. De igual forma, es importante mencionar el aumento de casos de forunculosis causados por MNT asociados a baños de pies en centros estéticos con aparición epidémica¹³⁹ cuyo origen es el agua contaminada de dichos baños¹⁴⁰. Estas infecciones son facilitadas por microabrasiones que ocurren después de la depilación y previa exposición de la piel al agua^{64, 141-142} (Figura 1). Hay que tener en cuenta, además, que estos cuadros clínicos pueden cronificarse como consecuencia de un diagnóstico equivocado que retrase considerablemente el inicio del tratamiento adecuado para estas infecciones.

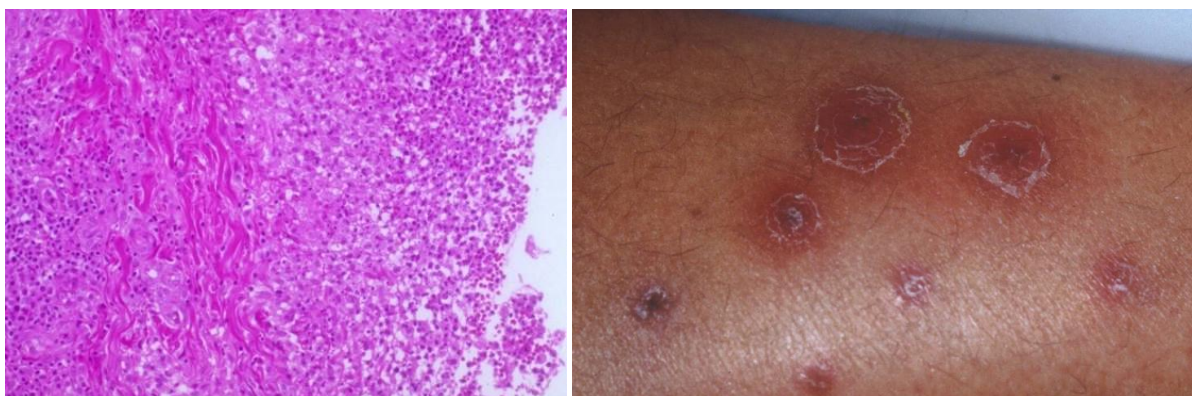


Figura 1. Folliculitis causada por *M. chelonae* (FJD, Madrid).

Como factores de patogenicidad importante de las micobacterias destacan la formación de biopelículas⁵, la capacidad de penetrar y sobrevivir intracelularmente⁵³, o su actividad hemolítica¹⁴³. En estos factores tienen un papel importante los glicopeptidolípidos (GPLs) que conforman parte de la pared de las micobacterias¹⁴⁴.

En 2008, Sexton y Harrison revisaron las condiciones predisponentes de enfermedad respiratoria por MNT en los últimos 20 años¹⁴⁵. Según NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*), se ha visto que las personas con una mayor predisposición a adquirir una infección por MCR son normalmente: sujetos de edad media o avanzada (en su mayoría mujeres de raza caucásica o asiática), altos y con un índice de masa corporal bajo¹⁴⁶, no fumadores, y con bronquiectasias, acusada escoliosis, déficit de α -1 antitripsina, *pectus excavatum* o prolapso de la válvula mitral^{23, 59, 145, 147-149}.

Un 36% de los pacientes con algún tipo de infección por MNT tienen mutaciones en el gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR)^{59, 128, 131, 147}. Dicha proteína interviene en el paso del cloruro a través de las membranas celulares y el déficit de ésta conlleva una alteración en la producción de sudor, jugos gástricos y moco. La principal causa de morbilidad y mortalidad de la fibrosis quística es la afectación pulmonar, responsable de un 95% de los fallecimientos, sobre todo debido a las infecciones repetidas originadas por la obstrucción bronquial. En general, distintos defectos en la inmunidad celular, tales como interleukina-12^{23, 150}, interleukina-23²³, interferón- γ ^{23, 150} o STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-1*) dan lugar a enfermedad extrapulmonar o diseminada por MNT.

Ciertos alelos de los antígenos leucocitarios humanos, polimorfismos en NRAMP1 (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein-1*) y polimorfismos en el receptor de la vitamina D están implicados en una mayor predisposición congénita de enfermedad pulmonar por MNT^{103, 151}.

Una causa más reciente de inmunosupresión que favorece el desarrollo de enfermedad por MNT es la introducción de agentes biológicos, especialmente los inhibidores del factor de necrosis tumoral TNF- α (infliximab, etanercept, adalimumab)^{23, 149, 152-156}, siendo el complejo MAC el grupo de especies implicado con mayor frecuencia¹⁴⁹. Además, los pacientes que utilizan estos agentes tienen un mayor riesgo de contraer otras infecciones granulomatosas, tales como la activación de la infección latente por tuberculosis¹⁵⁷⁻¹⁵⁸.

El patrón común de patogénesis celular de las infecciones por MNT más frecuente fue descrito por McGarvey y Bermudez¹⁵⁹. Las cepas de MNT pueden acceder al cuerpo humano a través del sistema gastrointestinal o respiratorio, o menos frecuentemente por inoculación directa. El complejo MAC puede resistir a la acción del ácido gástrico y tiende a ser capturado posteriormente por los enterocitos del íleon terminal. Dentro de las células epiteliales, se produce un cambio fenotípico que favorece la resistencia bacteriana frente a los macrófagos una vez que salen de estas células¹⁰³.

Las MCR pueden ser inhaladas a partir del polvo, agua y otros aerosoles. En la mayoría de las ocasiones son eliminadas por la inmunidad innata del hospedador mediante aclaramiento mucociliar y tos, no produciendo así ninguna patología¹⁰³.

1.5. Diagnóstico

1.5.1 Estudios de laboratorio

Siempre que resulte posible es muy importante hacer una identificación hasta llegar a nivel de especie²⁴, ya que las especies de MNT difieren en muchos aspectos de relevancia clínica^{125, 160}. El diagnóstico microbiológico de las infecciones por MNT incluye la observación microscópica directa de muestras clínicas, el cultivo de las mismas en medios selectivos y la identificación de las especies aisladas mediante técnicas fenotípicas, bioquímicas, cromatográficas y moleculares¹⁶¹.

Actualmente, la tecnología basada en la detección de la diana 16S ARNr (PCR), *hsp65*, *rpoB* y las técnicas de hibridación ayudan a diferenciar *M. tuberculosis* de otras micobacterias^{7, 25-26, 162-168}. Los análisis de estos genes son especialmente útiles para el diagnóstico e identificación de micobacterias debido, sobre todo, al lento crecimiento de estos microorganismos. Hoy día disponemos de herramientas que nos permiten caracterizar molecularmente las infecciones, tales como la electroforesis de campo pulsante (PFGE), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) o secuenciación mediante PCR de ITS (*Internal Transcribed Sequence*) o MIN33¹⁶⁹ (Figura 2).

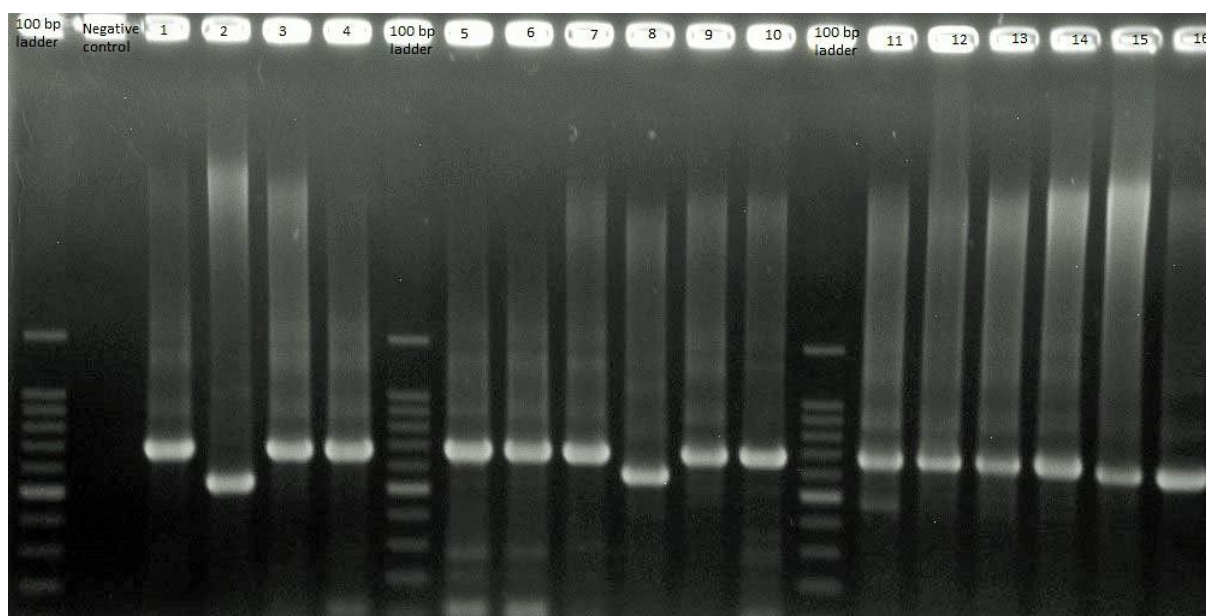


Figura 2. PCR MIN 33 para diferenciar *Mycobacterium chimaera* y *Mycobacterium intracellulare*.

1. *M. chimaera* AF1516 (control); 2. *M. intracellulare* 1406 (control); 3-16. Muestras ambientales. (Biological Sciences. Virginia, EE.UU.).

El examen microscópico es el método más sencillo, rápido y económico para el diagnóstico microbiológico, aunque presenta una sensibilidad muy inferior al cultivo (entre un 22-80%) y no permite distinguir entre especies (con alguna excepción, como es el caso de *M. kansasii*). Proporciona al clínico una orientación diagnóstica preliminar y ayuda a monitorizar la respuesta de los pacientes al tratamiento antimicobacteriano. También permite confirmar que el crecimiento observado en el cultivo es una micobacteria y detectar una posible contaminación¹⁷⁰. La sensibilidad depende de la concentración de micobacterias, por lo que es de suma importancia la buena elección de la muestra en cada caso. Así, en los niños con sospecha de infección pulmonar por micobacterias, o en los adultos a los que no se les puede inducir la producción de esputo, el lavado gástrico es la muestra de elección²³.

Las micobacterias tienen un alto contenido lipídico en su pared celular (ácidos micólicos) que las hace impermeables a un gran número de compuestos (Figura 3), una característica en parte responsable de la resistencia intrínseca de las micobacterias a antibióticos¹⁷¹.

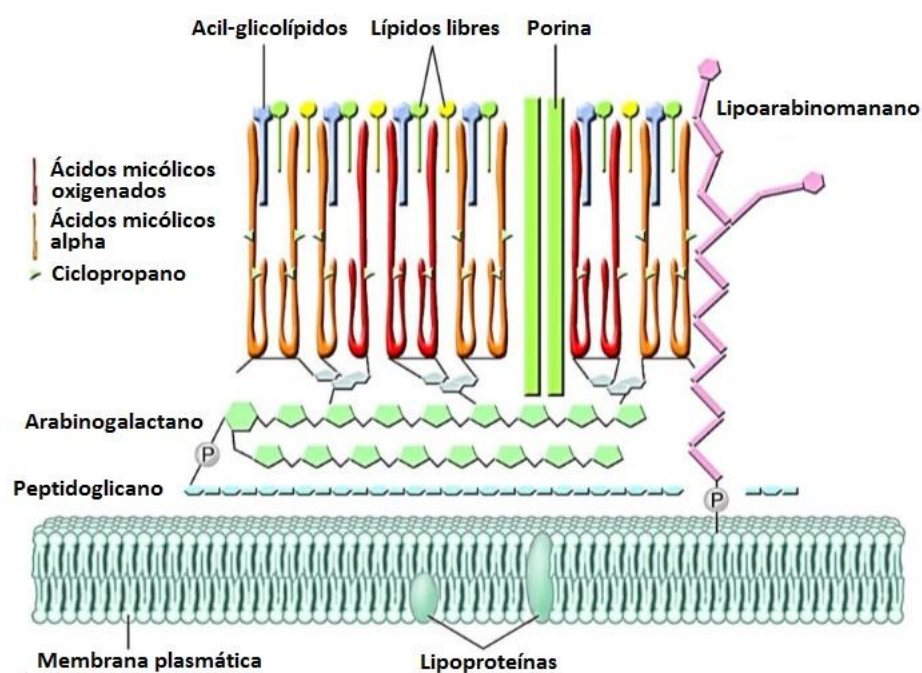


Figura 3. Representación esquemática de la envoltura celular micobacteriana¹⁷².

Los componentes estructurales de la envoltura celular son: la membrana plasmática, la pared celular compuesta por peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos, y una capa más externa (cápsula). También existen porinas y lipoarabinomano atravesando toda la pared y envoltura micobacteriana, respectivamente.

Debido a esta característica, para teñir las micobacterias se utilizan tinciones específicas entre las que se incluyen la tinción ácido-alcohol resistente (Ziehl-Neelsen y Kinyoun) o auramina-rodamina (Figura 4), siendo esta última de elección por su mayor sensibilidad²³.

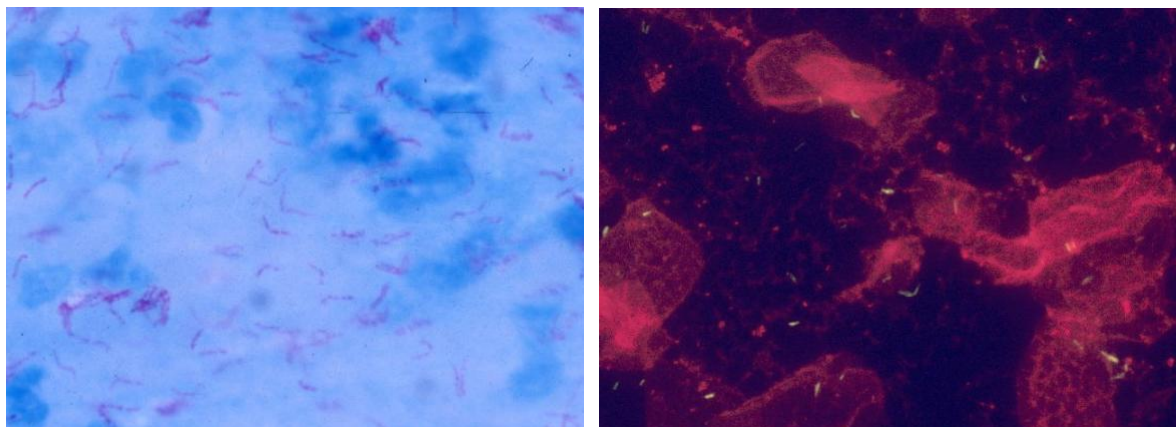


Figura 4. Técnicas de tinción específicas de bacilos ácido-alcohol resistentes en muestras clínicas.

a) Tinción Ziehl-Neelsen (FJD, Madrid)

b) Tinción de auramina (FJD, Madrid)

La identificación basada en pruebas bioquímicas es insuficiente para realizar una identificación correcta de los aislamientos. En el momento actual, sólo la identificación molecular y métodos cromatográficos permiten una identificación correcta de las distintas especies¹⁷³. En este sentido, existen sistemas comerciales que permiten identificar correctamente las especies más frecuentes (Figura 5).

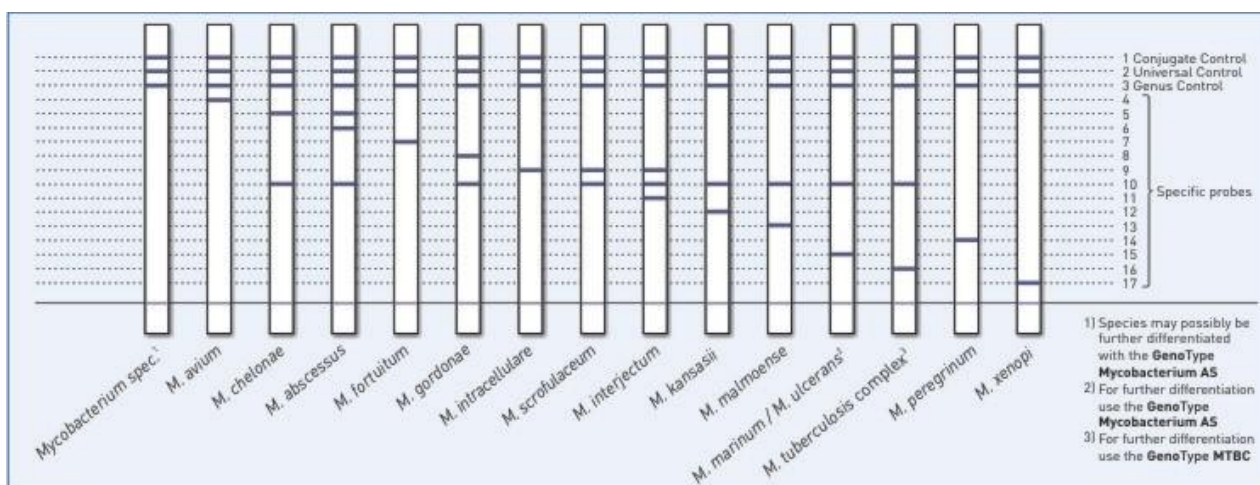


Figura 5. Sonda GenoType® Mycobacterium CM/AS.

Fuente: <http://www.hainlifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/genotype-mtbc.html>

La identificación de las especies menos frecuentes requiere de una aproximación más especializada. Puede ser necesaria la combinación de PCR-RFLP *Analysis* (PRA) con una amplia batería de pruebas bioquímicas, y en algunos casos se hace imprescindible la secuenciación de diversos genes.

Una nueva herramienta para la identificación de especies de MNT es la espectrometría de masas mediante *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight* (MALDI-TOF)¹⁷⁴. El método óptimo para la extracción de proteínas a partir de micobacterias y el poder discriminatorio de este método todavía no han sido establecidos.

1.5.2. Estudios de imagen

Las manifestaciones radiológicas de la infección pulmonar por micobacterias atípicas son muy variadas e incluyen la presencia de consolidación, cavitación, fibrosis, nódulos, bronquiectasias y/o adenopatías^{29, 133, 175-176} (Figura 6). Las manifestaciones clínico-radiológicas de la infección pulmonar por micobacterias atípicas varían en función de si el paciente tiene alguna afectación pulmonar preexistente, y de si es inmunocompetente o inmunodeprimido⁵⁹. Aunque la infección por micobacterias atípicas clásica puede ser indistinguible de la tuberculosis activa, por lo general es menos sintomática.

Los hallazgos radiológicos de la infección por micobacterias atípicas incluyen formas cavitadas en pacientes con afectación pulmonar, formas nodulares y bronquiectasias en pacientes inmunocompetentes, y adenopatías mediastínicas o hiliares en pacientes con SIDA⁵⁹.

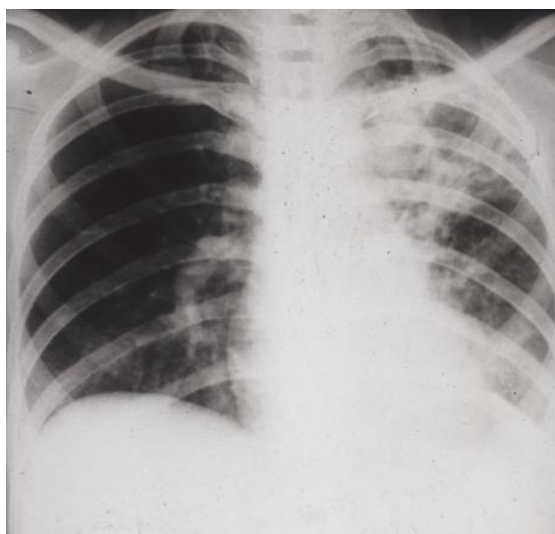


Figura 6. Imagen radiológica de infección pulmonar por *M. intracellulare* (FJD, Madrid).

1.5.3. Otras pruebas diagnósticas

Las micobacterias atípicas pueden presentar una reacción cruzada con *M. tuberculosis* en la prueba de *Mantoux* o de la Tuberculina, produciendo en general una menor reacción ante dicho test¹⁷⁷. Se ha experimentado con análogos del PPD (Derivado de proteína purificada) realizados a partir de diferentes especies de micobacterias atípicas pero debido a estas reacciones cruzadas su uso no es útil en la práctica clínica diaria¹⁷⁸. Algunos autores refieren que este test podría ser útil para el diagnóstico precoz de adenitis por MNT, aunque existen controversias a la hora de interpretar los resultados⁵⁴.

1.5.4. Criterios ATS/IDSA

La Sociedad Torácica Americana y la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (ATS/IDSA) recogen los criterios que ayudan al diagnóstico de enfermedad pulmonar y extrapulmonar causada por MNT³².

Los síntomas de enfermedad pulmonar por MNT suelen ser inespecíficos. La mayoría de los pacientes presentan tos crónica, con o sin producción de esputo o hemoptisis, fatiga o malestar general. Los síntomas constitucionales, tales como pérdida de peso, fiebre o sudores nocturnos, son menos frecuentes y ocurren aproximadamente en un 30-50% de los pacientes, indicando normalmente enfermedad avanzada^{32, 125, 179}.

Para el diagnóstico de enfermedad pulmonar muchas veces resulta complicado determinar si un cultivo es positivo como consecuencia de que en verdad existe una enfermedad o si es a causa de una posible contaminación o a una colonización transitoria/crónica del tracto respiratorio^{31, 59}. Se han descrito pseudo-brotes de MNT en hospitales como resultado de contaminaciones en los propios laboratorios, en los suministros de agua, o en el instrumental médico¹⁸⁰⁻¹⁸¹. Para evitar este tipo de problemas la ATS/IDSA recomienda que el diagnóstico de infección por MNT se haga solamente en presencia de datos clínicos, radiológicos y microbiológicos que apoyen la evidencia de infección^{32, 182}.

Cuando la radiografía no proporciona un resultado convincente al clínico, se recomienda incluir en la evaluación una tomografía computarizada de alta resolución (TCAR), que permite diferenciar entre colonización e infección invasiva²³. La TCAR puede mostrar imágenes de áreas dispersas de bronquiectasias, a menudo combinadas con infiltrados nodulares y

cavitados, con un patrón ocasional de "árbol en brote". Se requieren al menos 3 muestras de esputo a las que se les debe realizar tanto tinción ácido-alcohol resistente como cultivo (Tabla 3)³².

Para el diagnóstico de una enfermedad extrapulmonar (linfadenitis, infección osteoarticular, infección de piel y tejidos blandos) o diseminada por MNT se necesita una combinación de criterio clínico y microbiológico, apoyado en lo posible por una confirmación histopatológica³². Es importante la recogida de muestras de territorios estériles, incluyendo la sangre en el caso de infecciones diseminadas. El número de hemocultivos requerido para el diagnóstico es un tema en debate. Un solo hemocultivo tiene una sensibilidad del 90-95%. No obstante, parece razonable repetir el cultivo tras 1 o 2 semanas si persiste la sospecha clínica de infección diseminada. Tras la sangre, la médula ósea es la muestra de mayor rendimiento para ese tipo de infección. Los laboratorios que no puedan procesar estas muestras pueden optar por enviarlas a su centro de referencia o bien, alternativamente, tomar muestras de biopsias de ganglios linfáticos, bazo e hígado, fundamentalmente¹⁷⁰.

Tabla 3. Criterios clínicos y microbiológicos para el diagnóstico de enfermedad pulmonar por MNT³².

Criterios clínicos (ambos requeridos)
<ul style="list-style-type: none"> • Síntomas pulmonares, nódulos, o cavidades en radiografía torácica, o un escáner en TCAR que muestre bronquiectasias multifocales con múltiples nódulos pequeños • Exclusión de otros diagnósticos
Criterio microbiológico (al menos 1 de ellos)
<ul style="list-style-type: none"> • Cultivos positivos de al menos 2 muestras de esputo mediante expectoración. Repetir cultivos y extensiones en caso necesario • Cultivo positivo de al menos 1 lavado bronquial • Biopsia transbronquial o pulmonar con características histopatológicas micobacterianas (inflamación granulomatosa o tinción ácido-alcohol resistente positiva) y 1 o más muestras de esputo o lavados bronquiales con cultivo positivo para MNT
Consejos
<ul style="list-style-type: none"> • Consultar al especialista cuando se aíslen MNT en una localización infrecuente o que normalmente representa contaminación ambiental • Pacientes con sospecha de infección pulmonar por MNT deben ser monitorizados hasta que se establezca o excluya dicho diagnóstico • El diagnóstico de infección pulmonar por MNT no necesita la instauración <i>per se</i> de una terapia ya que es una decisión basada en los riesgos potenciales o beneficios que ésta conlleva para un paciente concreto

Cualquier paciente con sospecha de tener una enfermedad producida por MNT debe ser monitorizado hasta que se diagnostique o se excluya la existencia de dicha enfermedad. En cada caso se debe evaluar qué tratamiento es el más adecuado y los posibles riesgos-beneficios del mismo^{32, 183}. La monitorización durante el tratamiento incluye cultivos mensuales de esputo, con una duración del tratamiento de hasta al menos 12 meses más desde la negativización de las muestras²³. Las técnicas moleculares no sirven para llevar a cabo la monitorización del paciente dado que persisten positivas durante mucho tiempo²³.

1.5.5. Procedimientos invasivos

En muchos casos se hace necesario realizar una biopsia de piel, de los ganglios afectados y del pulmón para diagnosticar una infección por micobacterias atípicas¹²⁶. El tejido obtenido se puede utilizar para cultivos y para el examen histopatológico. Este último puede revelar granulomas tuberculoides, infiltrado difuso de histiocitos, células espumosas, paniculitis aguda y crónica, inflamación crónica inespecífica, abscesos cutáneos, granulomas supurativos y foliculitis necrotizante⁶⁹. Los granulomas supurativos son el rasgo más característico en la piel de las muestras de biopsia cutánea de las infecciones por micobacterias atípicas, presentándose en un 30-50% de los casos¹⁸⁴⁻¹⁸⁵.

1.5.6. La autofluorescencia como herramienta diagnóstica

La autofluorescencia intrínseca, incluyendo la presencia de autofluorescencia en el rango del cian (Ex. 438/24-Em. 483/32) es una característica que se ha encontrado previamente en diferentes microorganismos, incluyendo bacterias (ej. *Lactobacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*) y levaduras (ej. *Saccharomyces sp.*)¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. En el estudio de Bhatta *et al.* los espectros de emisión y excitación revelaron que las bacterias y los hongos se pueden diferenciar por su fluorescencia intrínseca con excitación UV¹⁸⁶. Adicionalmente, se han observado también diferencias entre distintas cepas del Género *Saccharomyces*, demostrándose con todo ello que la fluorescencia se puede utilizar con éxito para diferenciar distintas especies de microorganismos mediante la identificación de las huellas dactilares espectroscópicas, sin la necesidad de tinción fluorescente.

Dentro de las micobacterias, Patiño *et al.* fueron los primeros en detectar la presencia de autofluorescencia azul en diversas especies de micobacterias incluyendo *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. marinum*, *M. fortuitum*, y otras especies relacionadas como *Nocardia sp.* y

*Corynebacterium glutamicum*¹². Los autores observaron que todas las especies, excepto *C. glutamicum*, poseen la capacidad de emitir autofluorescencia, siendo una herramienta diagnóstica potencialmente rápida e importante. Más recientemente se han realizado estudios donde se ha detectado la presencia de autofluorescencia roja/verde en tejidos vivos de peces cebra emitida por *M. chelonae*¹⁸⁹, resultando de especial importancia para el *screening* de peces infectados que podrían llegar a infectar al ser humano.

1.6. Manejo clínico y terapéutico

El tratamiento de las infecciones producidas por micobacterias atípicas difiere mucho en función de la forma clínica de presentación. Debido al desarrollo de resistencias bacterianas, se recomienda el uso de al menos dos fármacos activos¹³⁴, y en algunos casos es necesario asociar un tratamiento quirúrgico (por ejemplo, en *M. ulcerans* y *M. scrofulaceum*)^{28, 59, 190}. El uso de un tratamiento combinado durante períodos de tiempo prolongados permite un efecto sinérgico superior y se reduce al mínimo la aparición de resistencias antimicrobianas. Sin embargo, las combinaciones tienen el riesgo de producir un gran número de efectos secundarios²⁸. Algunos de los tiempos recomendados de tratamiento terapéutico según el tipo de infección son, por ejemplo, de entre 18-24 meses en pacientes inmunocompetentes con infección clínica significativa por MNT, menos de 12 meses en infecciones del tracto respiratorio inferior, y por lo menos de 6 meses en casos de osteomielitis³².

Las micobacterias atípicas son resistentes a los fármacos antituberculosos convencionales, pero pueden ser sensibles a antimicrobianos de amplio espectro⁸. Las infecciones producidas por estos microorganismos pueden ser tratadas con varios antibióticos: amicacina, cefoxitina, ciprofloxacino, claritromicina, doxiciclina, imipenem, sulfametoxazol, o tobramicina¹¹. Claritromicina ha demostrado ser muy eficaz frente a una amplia gama de micobacterias atípicas, pero algunos microorganismos son resistentes¹⁹¹⁻¹⁹², por lo que se hace necesario realizar pruebas de sensibilidad a antibacterianos de forma individualizada. Incluso cuando estas cepas son sensibles a los macrólidos, claritromicina se debe usar con precaución, especialmente cuando se administra en monoterapia^{8, 193}.

En publicaciones recientes se postula la utilización de nuevos fármacos para el tratamiento de las infecciones por MCR, incluyendo las 8-metoxi-fluoroquinolonas (gatifloxacina,

moxifloxacina), linezolid, tigeciclina, telitromicina o isepamicina. La actividad *in vitro* de estos fármacos parece buena pero la experiencia clínica aún es limitada. Gatifloxacina parece tener buena actividad frente a *M. fortuitum*, pero no frente a *M. abscessus* y *M. chelonae*¹⁹⁴; la actividad de linezolid es variable frente a las 3 especies¹⁹⁴⁻¹⁹⁵; mientras que telitromicina ha resultado ser poco efectiva¹⁹⁶⁻¹⁹⁷. Sin embargo, los ensayos publicados sobre tigeciclina e isepamicina confieren a estos antimicrobianos una actividad similar a la de amicacina para un gran número de especies de MCR, incluidas las más habituales¹⁹⁷⁻¹⁹⁸.

La recomendación terapéutica viene dada por la especie y por la localización de la infección¹⁴. *M. abscessus* es considerada como una de las especies más virulentas y resistentes de MCR¹²². Por lo general, es resistente a imipenem, ciprofloxacino, cotrimoxazol y doxiciclina, y sensible a los macrólidos y amicacina^{9, 101, 194, 199}, variando su sensibilidad a cefoxitina desde un 7% hasta un 75%^{9, 101, 199-200}. *M. chelonae* tiene un fenotipo y un perfil de sensibilidad antimicrobiano similar a *M. abscessus*, siendo generalmente sensible a amicacina y a los macrólidos, y resistente a las quinolonas, cefoxitina, y cotrimoxazol, con una actividad del 30% y 40% frente a doxiciclina e imipenem, respectivamente^{9, 32, 101, 134, 194, 201}. En el tratamiento de infecciones producidas por *M. fortuitum*, los antibióticos recomendados son ciprofloxacino, imipenem, cotrimoxazol y amicacina. Sin embargo, la proporción de cepas sensibles a claritromicina es baja en comparación con la de otras especies de MCR^{9, 14, 101, 194}.

1.6.1. Tratamiento quirúrgico

Dentro del tratamiento quirúrgico, el drenaje quirúrgico, el desbridamiento, la retirada de cuerpos extraños y el tratamiento antibiótico combinado se incluyen, en muchas ocasiones, durante períodos de tiempo prolongado^{14, 112, 122}. En algunos casos, sobre la base de la evaluación clínica, un tratamiento adecuado requiere de un desbridamiento agresivo de todos los tejidos infectados y, en ocasiones, de la colocación de injertos de piel para cubrir defectos tisulares grandes¹⁴. El injerto no parece fomentar las infecciones recurrentes.

Por todo ello, el diagnóstico y el tratamiento debe ser multidisciplinar¹²⁶, incluyendo el aporte de especialistas en diferentes áreas: dermatólogos, infectólogos, microbiólogos, internistas y cirujanos plásticos.

1.7. Sensibilidad *in vitro* y mecanismos de resistencia antibiótica

No existe un sistema estandarizado para estudiar la sensibilidad antimicrobiana de la mayoría de MNT, y en algunas especies sigue existiendo una falta de correlación entre resultados *in vivo* e *in vitro*^{23, 59, 190, 202}. La resistencia natural de las micobacterias frente a algunos fármacos se relaciona, en gran parte, con su hidrofobicidad y, por lo tanto, con la permeabilidad de su pared celular. La pared celular de las micobacterias es rica en lípidos y forma una barrera importante a la penetración de compuestos antimicrobianos²⁰³. Para las especies más relevantes existen recomendaciones oficiales descritas en el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)²⁰⁴. La técnica de referencia recomendada para el estudio de sensibilidad de MNT es la microdilución en caldo²⁰⁵⁻²⁰⁶. Sin embargo, existen infecciones causadas por MNT que aún no tienen pautas de tratamiento ni de estudio de sensibilidad claramente establecidas.

Por otra parte, la técnica de referencia es difícil de llevar a cabo por laboratorios con un número pequeño de aislamientos. Se han evaluado técnicas alternativas para su utilización de forma individualizada, tales como la técnica disco-placa o el E-test, pero en ambos casos pueden existir problemas de reproducibilidad, lectura, etc¹⁷⁰.

Existen, además, otros problemas relacionados con los mecanismos de resistencia que no pueden detectarse fácilmente con el antibiograma, como la adquisición de genes de resistencia a macrólidos^{191, 207-209}, mutaciones dirigidas o la presencia de bombas de eflujo, tales como *tap*²¹⁰, *tetV*²¹¹, *lfrA*²¹² and *efpA*²¹³, que causan resistencia fenotípica a las quinolonas y a los macrólidos^{209-210, 214-219}. En el caso de claritromicina, el CLSI recomienda hacer una primera lectura de la concentración mínima inhibitoria (CMI) al tercer día y posteriormente en el día 14 para determinar la presencia de resistencia inducible a los macrólidos por genes *erm*³².

1.7.1. Metilasas y genes *erm* como mecanismo de resistencia a macrólidos

1.7.1.1. Definición

Muchas MCR son consideradas sensibles a los macrólidos como claritromicina y azitromicina, antibióticos que se incluyen en la terapia de muchas infecciones producidas por estos microorganismos^{11, 32, 98, 120, 220}.

El problema que presentan estos compuestos es el desarrollo de una resistencia fenotípica secundaria a mutaciones específicas en la región peptidiltransferasa del gen 23S del ribosoma^{13, 221}. La resistencia viene dada a través de la metilación de los ARN ribosomales 23S que dificulta la unión de los macrólidos a los ribosomas^{191, 208, 222}.

Por otra parte, las metilasas son enzimas inducibles descritas en múltiples especies de bacterias cuyo efecto en la resistencia antimicrobiana fenotípica puede no ser detectado en los tests antimicrobianos convencionales²²², lo que podría explicar la falta de eficacia de este grupo de antibióticos en el tratamiento de infecciones por micobacterias²⁰⁸.

1.7.1.2. Tipos de metilasas

Este mecanismo de resistencia intrínseco a los macrólidos asociado a metilasas ha sido detectado en múltiples especies de micobacterias, incluyendo 5 clases diferentes de genes *erm* (*erythromycin ribosome methylation*): *erm* (37) *M. tuberculosis* complex²²³⁻²²⁵, *erm* (38) grupo *M. smegmatis*^{192, 222, 226}, *erm* (39) grupo *M. fortuitum*^{191, 222}, *erm* (40) *M. mageritense* y *Mycobacterium wolinsky*²²², y *erm* (41) *M. abscessus* y *Mycobacterium bolletii*²⁰⁸. Cabe destacar la falta de genes *erm* en *M. chelonae*²²⁷, lo que puede explicar por qué las infecciones producidas por esta especie responden mejor a la quimioterapia basada en macrólidos, y por qué carecen o solo muestran pequeños cambios en las CMIs de claritromicina en incubaciones prolongadas. En términos de manejo terapéutico, este gen puede desempeñar también un papel fundamental como marcador para distinguir las diferentes especies de MCR^{11, 227}.

1.8. Biopelículas

1.8.1. Definición

En el siglo XVII, Van Leeuwenhoek, utilizando sus microscopios artesanales, fue el primero en describir la presencia de microorganismos adheridos a superficies dentales, por lo que se le considera como el descubridor de las biopelículas bacterianas²²⁸.

Tres siglos después, en 1978, J. W. Costerton *et al.*, tratando de encontrar una explicación a la resistencia bacteriana frente a los desinfectantes en sistemas de aguas industriales, descubrieron la existencia de comunidades bacterianas embebidas en matrices glucoproteicas

desarrolladas en superficies en contacto con el agua, a las que denominaron *biopelículas*²²⁹. A esta forma de organización bacteriana le achacaron la resistencia investigada.

La biopelícula bacteriana es un importante factor de patogenicidad. J. W. Costerton definió la biopelícula como "una comunidad estructurada de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo", representando una manera de permitir el crecimiento y supervivencia en diferentes ambientes²³⁰.

La capacidad de adherencia y formación de biopelículas no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas (pH, niveles de nutrientes, hierro, oxígeno, fuerza iónica y temperatura) todos los microorganismos son capaces de formar biopelículas²³¹. Esta capacidad está extendida entre las diferentes especies de MNPCR^{52, 232-233} y, además, está relacionada con el significado clínico²³⁴. La temperatura óptima en el caso de MNT es de entre 28 y 37°C.

Aunque la composición de la biopelícula es variable en función del sistema de estudio, en general, el componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 98% del contenido total⁷⁰. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz de la biopelícula es un complejo formado por polisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias²³⁵⁻²³⁸, que se conocen como "sustancias poliméricas extracelulares"^{70, 239}. Ojha *et al.* destacan que en el caso de las micobacterias la composición de la matriz extracelular difiere significativamente con respecto a la de otras bacterias, siendo especialmente más rica en lípidos que en polisacáridos²⁴⁰.

La arquitectura de la matriz de la biopelícula no es sólida sino que presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta en las zonas más profundas de la biopelícula⁷⁰ (Figura 7).

La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro de la biopelícula existan entornos diferentes con concentración variable de nutrientes, pH u oxígeno²⁴¹. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad de las bacterias que conforman la biopelícula, dando lugar a células con diferente expresión génica²⁴².

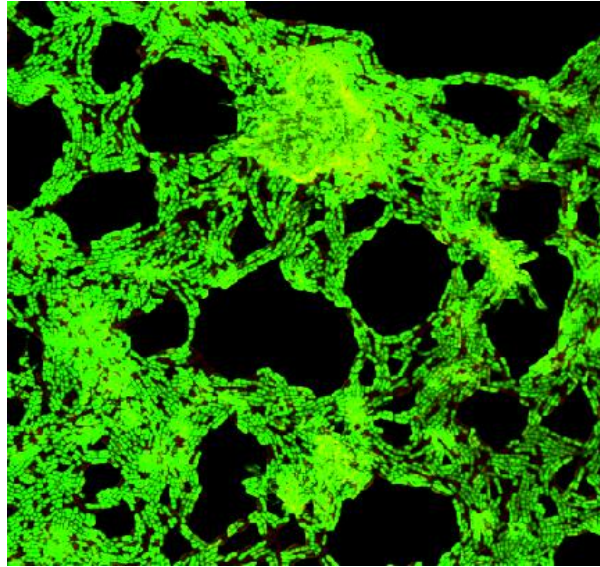


Figura 7. Biopelícula de *M. smegmatis* a las 24h (tinción Live/Dead BackLight®).

Las biopelículas pueden estar formadas por una sola especie bacteriana, pero en la naturaleza normalmente están formadas por muchas especies bacterianas, así como hongos, algas, levaduras y protozoos. Por ejemplo, las biopelículas de la placa dental contienen típicamente más de 500 especies bacterianas²⁴³. Es de destacar que las interacciones que se establecen entre especies no siempre son de simbiosis, como es el caso de la interacción que existe entre *M. avium* y *Methylobacterium* spp. en la formación de biopelículas (Figura 8).

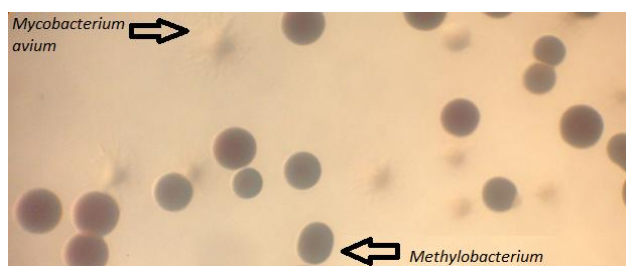


Figura 8. Formación de biopelículas de *M. avium* y *Methylobacterium* spp.

a) Aislamiento de *Methylobacterium* spp y *M. avium* en placa 7H10 (Virginia, EE.UU.)

b) Reactor del CDC (Virginia, EE.UU.) con discos de acero inoxidable donde se hace crecer la biopelícula

1.8.2. Crecimiento planctónico frente a crecimiento en biopelícula

Las *Bacteria* coexisten en dos formas en relación con el medio que las rodea, presentando las siguientes características^{236, 238}:

- a) Las *Bacteria* planctónicas o de vida libre: permiten la propagación de las bacterias a otras superficies y son más susceptibles al tratamiento antimicrobiano. Pueden adherirse a superficies y convertirse en células sésiles.
- b) Las *Bacteria* contenidas en biopelículas: forman colonias de microorganismos sésiles. Desde la biopelícula pueden desprenderse células, convirtiéndose en células planctónicas, caracterizadas por una rápida dispersión y multiplicación.

El 99% de las células bacterianas se presenta en calidad de biopelículas, mientras que el 1% restante subsisten en los estadios planctónicos hasta que logran constituir biopelículas²⁴⁴⁻²⁴⁶.

Dependiendo de las condiciones ambientales, una misma bacteria puede crecer sésil, adherida a una superficie o crecer de forma planctónica libremente en el medio líquido.

1.8.3. La adherencia primaria y el desarrollo de la biopelícula

El proceso de formación de una biopelícula se puede describir en 4 fases: adhesión reversible, adhesión irreversible, maduración y dispersión²³⁶ (Figura 9).

La etapa inicial del proceso de formación de la biopelícula es la adherencia sobre la superficie²⁴¹. Los cationes metálicos tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} juegan un papel importante en la adherencia microbiana y en la formación de biopelículas²⁴⁷. En bacterias gramnegativas se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los curli son importantes para la etapa de adherencia primaria^{70, 248-249}. La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso, no parece ser un requisito esencial debido a que muchas bacterias grampositivas inmóviles, como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biopelículas. En el caso de las bacterias grampositivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie (AtIE, Bap, Esp) en esta primera etapa de adherencia primaria²⁵⁰⁻²⁵¹, al igual que proteínas de unión a fibronectina (FnBPA y FnBPB)²⁵², proteínas de unión a colágeno

Cna²⁵³ y factor de aglutinación A y B (ClfA y ClfB)²⁵⁴⁻²⁵⁵ que se unen a componentes de la matriz extracelular en el caso de *S. aureus*.

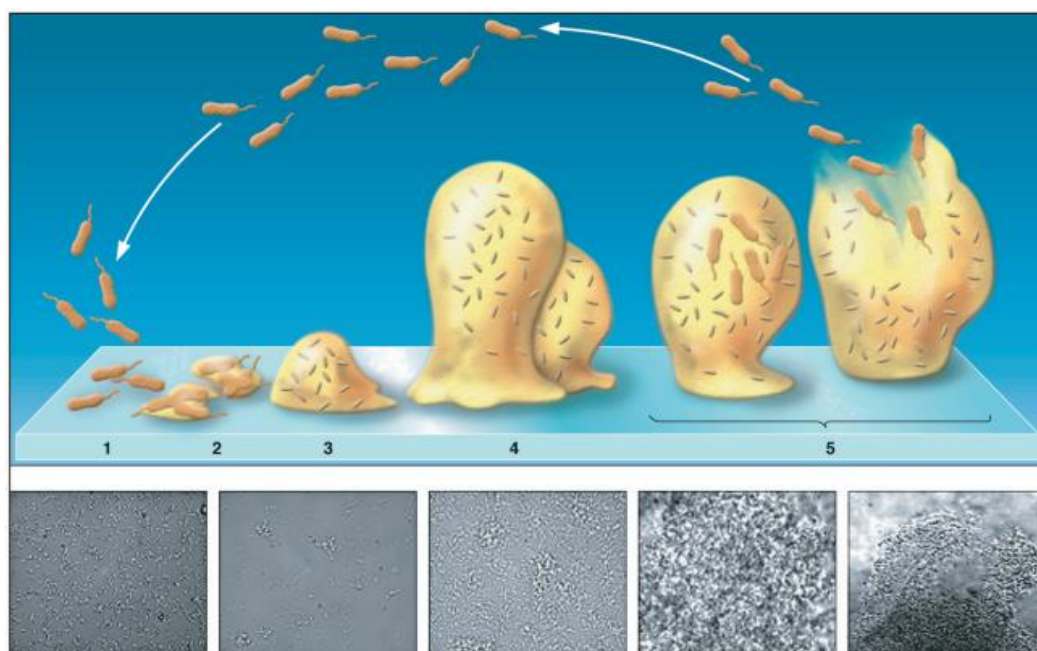


Figura 9. Proceso de formación de una biopelícula.

Este diagrama muestra el esquema de las diferentes etapas del desarrollo de una biopelícula: **1.** Fase reversible de adhesión; **2.** Unión irreversible; **3.** Maduración-1; **4.** Maduración-2; **5.** Dispersión. Debajo del dibujo se muestran 5 micrografías electrónicas que reflejan cómo se ve realmente la biopelícula en cada etapa. D. Davis. *Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms*. PLoS Biol, Vol 5, issue 11.

Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando y diferenciando así las estructuras de la biopelícula²⁵⁶.

En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz de la biopelícula y se forman canales dentro de dichas estructuras.

La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *Pseudomonas aeruginosa*, celulosa en *Salmonella typhimurium*, o un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *Vibrio cholerae*, etc. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula.

Finalmente, algunas bacterias de la matriz de la biopelícula se liberan de la misma para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de desarrollo de formación de la biopelícula²⁵⁶⁻²⁵⁷. Como resultado, las biopelículas se convierten en una fuente de infección persistente y crónica. Algunos autores sugieren que esto ocurre debido a que existen bacterias deficientes en la síntesis del exopolisacárido y por tanto deficientes en la formación de la biopelícula, permitiendo a la bacteria mantener un pequeño porcentaje de la población incapaz de sintetizar el exopolisacárido y poder escapar de la biopelícula²⁵⁸. Algunos autores sostienen que en algunas bacterias el proceso de liberación desde la biopelícula se produce gracias a la producción de enzimas que degradan de forma específica el exopolisacárido de la biopelícula.

1.8.4. Regulación del proceso de formación de la biopelícula

El proceso de formación de las biopelículas está regulado por señales químicas. Las bacterias se comunican unas con otras mediante moléculas señales denominadas "autoinductores", y a este proceso de comunicación se le conoce como *quorum sensing* (QS) o autoinducción^{246, 259}.

El sistema de QS es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, autoinductor, que permite a la bacteria sentir la densidad de población existente²⁶⁰. En bacterias gramnegativas el autoinductor es principalmente acilhomoserina lactona, mientras que en bacterias grampositivas son péptidos²⁶¹⁻²⁶². Cuando se acumula en el medio una suficiente cantidad del autoinductor (habitualmente debido al aumento en la densidad de población) se activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos.

1.8.5. Biopelículas bacterianas e infección

En la actualidad el principal problema que se nos presenta es la presencia de bacterias ubicuas capaces de producir infecciones de tipo crónico²⁶³, que responden pobremente a los tratamientos antibióticos y no pueden prevenirse mediante inmunización.

Las biopelículas están implicadas en más del 80% de enfermedades inflamatorias e infecciosas crónicas causadas por bacterias²³⁵. Un ejemplo paradigmático de estas infecciones, cada vez más frecuente, es el relacionado con dispositivos médicos (catéteres, tubos endotraqueales, dispositivos intrauterinos, marcapasos, prótesis articulares)^{70, 228} y otras infecciones crónicas

como otitis media, endocarditis, úlceras gastrointestinales, neumonía en pacientes con fibrosis quística, infecciones urinarias crónicas, o infecciones de próstata y osteomielitis^{70, 104-106, 108-111, 264-267}. Las bacterias formadoras de biopelículas más comúnmente aisladas en muestras clínicas incluyen *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, y *P. aeruginosa*²⁶⁸ (Tabla 4).

El análisis directo de los implantes y tejidos de estas infecciones muestra claramente que la bacteria responsable de la infección crece adherida sobre el tejido o el implante produciendo biopelículas. Dentro de la biopelícula, las bacterias están protegidas de la acción de los anticuerpos, del ataque de las células fagocíticas y de los tratamientos antimicrobianos.

Tabla 4. Lista de algunas infecciones humanas en las que están involucradas biopelículas bacterianas²³⁵.

Biopelícula	Especie bacteriana
Caries dental	Cocos grampositivos acidogénicos (ej. <i>Streptococcus</i>)
Periodontitis	Bacterias anaeróbicas orales gramnegativas
Otitis media	<i>Haemophilus influenzae</i>
Infecciones del sistema músculo-esquelético	Cocos grampositivos (ej. <i>Staphylococcus</i>)
Fascitis necrotizante	<i>Streptococcus</i> Grupo A
Osteomielitis	Varias especies bacterianas y fúngicas, generalmente mezcladas
Prostatitis bacteriana	<i>Escherichia coli</i> y otros bacilos gramnegativos
Endocarditis	<i>Streptococcus viridans</i>
Neumonía por fibrosis quística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia ceparia</i>
Suturas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
Cistitis por catéteres urinarios	<i>Escherichia coli</i> y otros bacilos gramnegativos
Tubos endotraqueales	Bacterias y hongos
Válvulas mecánicas del corazón	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
Injertos vasculares	Cocos grampositivos
Dispositivos ortopédicos	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
Neumonía (cuidados intensivos)	Bacilos gramnegativos

1.8.5.1. Detección de biopelículas en dispositivos médicos

Un procedimiento ampliamente practicado para detectar la colonización bacteriana en la punta del catéter es el método desarrollado por Maki²⁶⁹, pero esta técnica puede tener una sensibilidad limitada²⁷⁰. Los métodos que detectan y cuantifican las biopelículas tanto en la superficie interna (luminal) como en el exterior de los catéteres proporcionan una imagen verdadera de la colonización por la biopelícula bacteriana⁷⁰. Kite *et al.* también propusieron una técnica de cepillado endoluminal para la cuantificación de organismos en biopelícula asociados en catéteres²⁷¹. Para el resto de implantes la metodología está mucho menos estandarizada, por lo que su procesamiento para el diagnóstico de infección asociada a implantes es muy variable.

Un método mucho más fiable es el uso de fuerzas mecánicas (por ejemplo, sonicación o agitación con vórtex)²⁷² para eliminar los microorganismos que forman biopelículas, que a continuación se pueden cuantificar por medio de recuento en placa o técnicas de tinción fluorescentes. Ejemplos de tales métodos se describen en los artículos de Tenney *et al.*²⁷³, Sherertz *et al.*²⁷⁴, Donlan *et al.*²⁷⁵ y Trampuz *et al.*²⁷⁶. Esta metodología se considera hoy en día de referencia en el diagnóstico de estas infecciones en determinados implantes (sobre todo ortopédicos)²⁷⁷.

1.8.6. Biopelículas y resistencia antibiótica

La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biopelículas de las infecciones agudas es su respuesta a tratamientos antibióticos²³⁸. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biopelículas normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, producen episodios recurrentes y la mayoría de las veces deben resolverse sustituyendo el implante²⁷⁸. Esto se debe a que las bacterias de la biopelícula pueden ser mucho más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido²⁷⁹.

En las biopelículas existe un ambiente muy dinámico y la tasa de intercambio de material genético es muy elevada, sobre todo la mediada por plásmidos²⁸⁰⁻²⁸². El efecto sobre la sensibilidad antibiótica puede ser intrínseca (inherente en el modo de crecimiento de biopelícula) o adquirida (causada por la adquisición de plásmidos de resistencia)⁷⁰. Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómicas que pueden codificar resistencia a

múltiples antimicrobianos (antibióticos, desinfectantes, metales pesados)^{2, 70, 283}, y al mismo tiempo la información para diversos factores de virulencia (fimbrias, exoenzimas que potencian la invasividad, cápsulas antifagocíticas, toxinas, sistemas para atrapar hierro, etc.). A ese conjunto de información genética es a lo que se ha denominado "islas de patogenicidad".

Las biopelículas, además de la resistencia asociada a la transferencia de plásmidos, presentan una resistencia intrínseca dada por su arquitectura, cambios metabólicos, cambios genéticos o formación de endosporas²⁸⁴:

- a) Arquitectura de la biopelícula: la matriz de exopolisacáridos actúa como amortiguador frente a los cambios en el entorno físico e influye igualmente en la difusión física y química de los antibióticos²⁸⁵.

Se sabe que, en algunos casos, las bacterias en las biopelículas son mucho menos sensibles a los antibióticos debido a la escasa penetración de los antimicrobianos a través de la película superficial que cubre la comunidad microbiana y a la inactivación de los antimicrobianos por la matriz extracelular, dando lugar a una lenta o incompleta actividad del antimicrobiano^{70, 286-289}.

- b) Cambios metabólicos: las limitaciones de oxígeno²⁹⁰⁻²⁹² y nutrientes²⁹³ dentro de la biopelícula conllevan una baja actividad metabólica de las bacterias que la conforman⁷⁰, sobre todo de las bacterias situadas en las capas más profundas²⁹⁴. Este estado de lentificación da lugar a una mayor resistencia a los antimicrobianos^{2, 70, 295-296}. Así, por ejemplo, Tresse *et al.* describen como los aminoglucósidos resultan menos eficaces contra la misma bacteria en condiciones anaeróbicas que aeróbicas²⁹¹. Además, no puede descartarse el efecto debido a la acumulación de productos ácidos de la biopelícula que provocan diferencias significativas de pH entre el exterior y el interior de éste²⁹⁷⁻²⁹⁸, interfiriendo también en la actividad antibiótica.

También se ha demostrado que la supervivencia de las bacterias en las biopelículas ante la presencia de antibióticos puede ser debido a la existencia de "células persistentes" (*persisters*) especiales, que son tolerantes a diversos fármacos²⁹⁹⁻³⁰².

- c) Cambios genéticos: la elevada tasa de transferencia genética conlleva modificaciones en la fisiología de las bacterias de la biopelícula debido a la aceptación y recombinación de genes específicos que potencian mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos. No obstante, en el año 2001 Stewart y Costerton expresaron sus dudas al respecto, señalando que cuando las bacterias son dispersadas desde una biopelícula, con frecuencia se tornan rápidamente sensibles a los antibióticos, lo que sugeriría que tal resistencia no sería adquirida vía mutaciones o recombinación, sino mediante la activación/desactivación de genes ya existentes en las propias bacterias relacionada con el fenómeno del QS.
- d) Formación de endosporas: esta hipótesis se sustenta en la posible génesis de una subpoblación de bacterias en biopelícula con un estado fenotípico muy especial y altamente protegido, con una diferenciación semejante a endosporas. Este estado de latencia en micobacterias se ve favorecido ante situaciones de estrés tales como la falta de oxígeno o nutrientes³⁰³⁻³⁰⁴ (Figura 10).

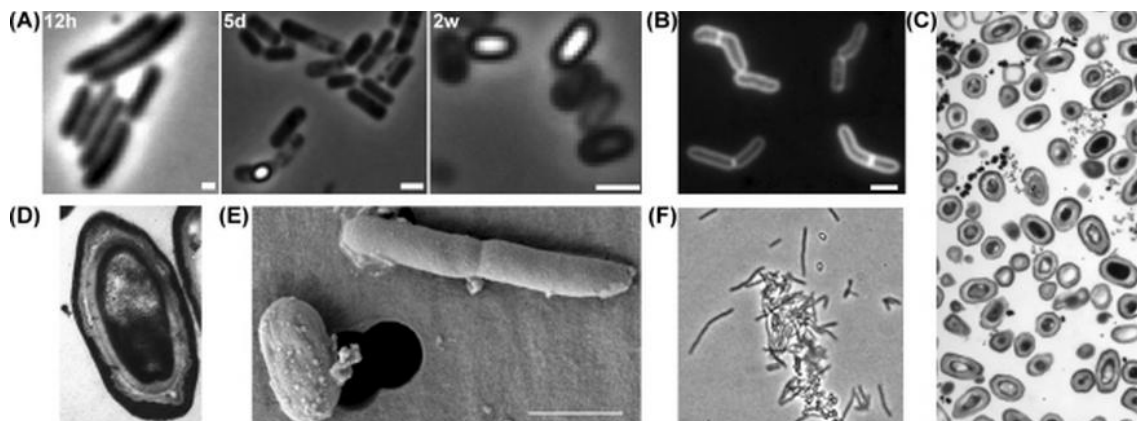


Figura 10. Formación de endosporas en *M. marinum*.

(A) Contraste de fases: célula vegetativa, 12h; endospora, 5 días; y esporas, 2 semanas. **(B)** Células en división. **(C)** Diversidad morfológica de esporas; imagen $\times 2.000$. **(D)** Espora madura; imagen $\times 60.000$. **(E-F)** Espora madura junto a célula vegetativa. Imagen obtenida en Singh, B. et al., *Growth, cell division and sporulation in mycobacteria*.

1.8.7. Biopelículas y tratamiento

El NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) no cuenta con un método aprobado para la evaluación de la eficacia de los agentes antimicrobianos contra los organismos asociados a biopelículas.

Los estudios de sensibilidad a los antimicrobianos, que se realizan rutinariamente en la clínica, están diseñados para medir la sensibilidad frente al antimicrobiano de la bacteria crecida de forma planctónica, sin tener en cuenta que los resultados obtenidos pueden no ser extrapolables a esa misma bacteria cuando está creciendo en el interior de una biopelícula⁷⁰. Las concentraciones de los agentes antimicrobianos, requeridos para inactivar los microorganismos asociados a biopelículas, son mucho mayores que las necesarias para inactivar los microorganismos no asociados a biopelículas⁷⁰.

Se han sugerido diversos protocolos para el ensayo de agentes antimicrobianos contra las biopelículas²⁹⁴. Un método aceptable sería aquel que pueda predecir la sensibilidad de la biopelícula bajo condiciones que simulen la situación *in vivo*⁷⁰.

La estrategia más eficaz para el tratamiento de las infecciones asociadas a dispositivos médicos es la retirada del dispositivo contaminado por la biopelícula bacteriana^{70, 134}. Así, por ejemplo, el uso de antimicrobianos junto con la eliminación del catéter intravascular conduce a la resolución del proceso infeccioso en más del 90% de los casos^{101, 135, 305-311}. Cuando un dispositivo médico interno es colonizado por una biopelícula, se ha demostrado que a lo largo del tiempo las bacterias que conforman la biopelícula son mucho menos sensibles a los agentes antimicrobianos que cuando se encuentran formando biopelículas más jóvenes. Además, si los organismos con resistencia adquirida están presentes en la biopelícula, la probabilidad de transferencia de un plásmido de resistencia puede aumentar con el tiempo⁷⁰.

Se ha visto que ciertos grupos terapéuticos son más eficaces que otros para el tratamiento de infecciones asociadas a biopelículas, como rifampicina, ciprofloxacino o gentamicina¹⁸. Sin embargo, dadas las altas concentraciones de antimicrobiano requeridas en algunos casos, puede ser difícil o imposible lograr concentraciones del antimicrobiano inhibidor dentro de la biopelícula en el sitio de la infección (tejido o sangre)⁷⁰.

Uno de los enfoques para hacer superficies de biomateriales resistentes a la formación de biopelículas es recubrir la superficie de los mismos con sustancias bactericidas/bacteriostáticas. Así, existen trabajos donde se inhibe significativamente la formación de biopelículas por *S. epidermidis* con aleaciones de titanio recubiertas con vancomicina³¹².

Los antibióticos se han utilizado para impregnar catéteres para prevenir la formación de biopelículas³¹³⁻³¹⁶. En algunos estudios se describe el uso de catéteres recubiertos que combinan diferentes antimicrobianos como minociclina y rifampina³¹⁷ o clorhexidina y sulfadiazina de plata³¹⁸. Sin embargo, el uso de antibióticos puede conducir a la selección de la resistencia a los antibióticos e incluso inducir la formación de biopelícula³¹⁹.

Los metales pesados también han sido utilizados como agentes antibiopelícula mediante el depósito de plata en las superficies de biomateriales utilizando distintas tecnologías de recubrimiento³²⁰⁻³²¹. La plata es uno de los agentes bactericidas más fuertes, aunque el mecanismo de acción del mismo todavía no está claro. Se ha observado que cuando los iones de plata penetran en las células, el ADN se condensa y se pierde la capacidad de replicación, produciendo la muerte celular. Los iones de plata también podrían inactivar las proteínas mediante la reacción con los grupos tiol³²²⁻³²⁴. Las nanopartículas de plata han sido estudiadas por su propiedad antimicrobiana. Debido a que las nanopartículas de plata tienen una gran área de superficie, pueden interactuar mejor con los microorganismos, penetrando en el interior de las bacterias y reaccionando con las proteínas y el ADN, lo que lleva a la interrupción de la cadena respiratoria y la división celular, y por lo tanto a la muerte celular³²².

Otros grupos de estudio han visto en *Staphylococcus* que el empleo de agentes mucolíticos como N-acetil-cisteína (NAC) podría interferir con la formación de exopolisacáridos en las biopelículas e inhibir su formación³²⁵, al igual que los agentes quelantes^{247, 326}. Concentraciones de NAC de 0,5-1 mg/ml han mostrado importantes reducciones en la producción de exopolisacáridos por *P. aeruginosa*³²⁷. De igual forma, se han desarrollado estudios para degradar componentes de la matriz tales como polisacáridos, ADN y proteínas³²⁸.

El Tween 80 es un agente tensioactivo no iónico y un detergente que inhibe la formación de biopelículas formadas por bacterias tales como *P. aeruginosa* a concentraciones tan bajas como 0,001%, y es bien tolerado en los tejidos humanos³²⁹. En el caso de las micobacterias, J.O. Falkinham, III describe cómo concentraciones de Tween 80 del 0,1-1,0% pueden reducir la agregación bacteriana y aumentar la sensibilidad de las células a agentes antimicrobianos¹⁵.

Dada la creciente importancia de las infecciones asociadas a biopelículas, parece urgente que se introduzcan nuevos métodos de selección de antimicrobianos y que se desarrollen, además, protocolos sencillos diseñados para medir la sensibilidad frente a antibióticos de las bacterias en biopelículas²⁹⁶. Los estudios en desarrollo más novedosos para prevenir y tratar las infecciones causadas por biopelículas incluyen pequeñas moléculas y enzimas, y recubrimientos antiadherentes y bactericidas, los cuales podrían conducir a terapias antibiopelículas superiores al tratamiento antibiótico³³⁰.

2. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

Se establecen tres hipótesis para la realización de este estudio sobre análisis estructural y presencia de autofluorescencia en biopelículas formadas por micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido:

1. La fluorescencia intrínseca o autofluorescencia descrita en algunos microorganismos, incluyendo *M. tuberculosis*, podría ser detectada en MNPCR y abriría nuevas posibilidades en el estudio de las biopelículas formadas por estos organismos.
2. El conocimiento de los cambios metabólicos que experimentan las micobacterias dentro de la biopelícula nos ayudaría a comprender mejor la capacidad patogénica de las diferentes especies y su implicación clínica.
3. El estudio del efecto de distintos antibióticos, solos o en combinación con agentes antibiopelícula, sobre biopelículas formadas por MNPCR nos ayudaría a conocer los fármacos que mejor actúan sobre las mismas y a enfocar mejor el tratamiento antimicrobiano.

3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Objetivo general

Estudio de la distribución y el comportamiento de una biopelícula formada por MNPCR bajo diferentes condiciones analizando distintos parámetros a lo largo del desarrollo de la misma.

Objetivos específicos

1. Determinación de las características fenotípicas de biopelículas formadas por MNPCR: velocidad de crecimiento, superficie cubierta, porcentaje de bacterias muertas y autofluorescencia mediante microscopía confocal láser de barrido.
2. Estudio de la sensibilidad *in vitro* frente a amicacina, ciprofloxacino y claritromicina mediante la técnica de microdilución en caldo (CMI) de MNPCR.
3. Estudio de la sensibilidad de biopelículas (CMEB) formadas por MNPCR, empleando amicacina, ciprofloxacino y claritromicina con el objetivo de determinar la influencia de la formación de biopelículas en el desarrollo de resistencias a antimicrobianos.
4. Estudio de cambios en las características fenotípicas de biopelículas formadas por MNPCR frente a amicacina, ciprofloxacino y claritromicina en relación con la autofluorescencia, superficie cubierta, espesor y porcentaje de bacterias muertas.
5. Estudio de la sensibilidad *in vitro* de MNPCR frente a agentes antibiopelícula (Tween 80, NAC) mediante la técnica de microdilución en caldo (CMI).
6. Estudio de la sensibilidad de biopelículas (CMEB) formadas por MNPCR frente a amicacina, ciprofloxacino y claritromicina combinados con agentes antibiopelícula (Tween 80, NAC) con el objetivo de determinar si la adición de agentes antibiopelícula disminuye el desarrollo de resistencias a antimicrobianos.
7. Estudio de cambios en las características de biopelículas formadas por MNPCR frente a agentes antibiopelícula (Tween 80, NAC) empleando los mismos parámetros anteriormente descritos.


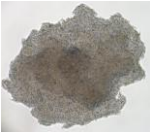
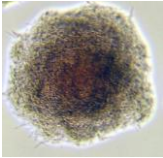
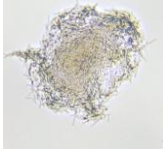
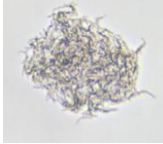

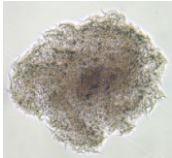
4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Micobacterias empleadas en los estudios

4.1.1. Cepas de colección

Se emplearon las cepas tipo de MNPCR especificadas en la Tabla 5.

Tabla 5. Cepas ATCC de MNPCR empleadas en el estudio (FJD, Madrid).

Microorganismo	Morfología colonia medio Middlebrook 7H11	Número de cepa	Patogenicidad
<i>M. abscessus</i>		DSM 44196	Patógeno humano habitual
<i>M. chelonae</i>		ATCC 19235	Patógeno humano habitual
<i>M. fortuitum</i>		ATCC 6841	Patógeno humano habitual
<i>M. mageritense</i>		ATCC 700351	Patógeno humano infrecuente
<i>M. mucogenicum</i>		DSM 44124	Patógeno humano infrecuente
<i>M. peregrinum</i>		ATCC 14467	Patógeno humano infrecuente
<i>M. smegmatis</i>		ATCC 607	Patógeno humano infrecuente

Todas las cepas se mantuvieron congeladas a -20°C en viales de leche desnatada estéril (Oxoid, Reino Unido) hasta que se realizaron los experimentos. Antes de cada estudio se obtuvo un cultivo axénico de cada *Bacteria*.

4.2. Análisis estructural mediante microscopía confocal láser de barrido

El desarrollo de biopelículas de las siete cepas tipo se estudió a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96h), empleando placas sin recubrimiento e hidrofóbicas de 2x4 pocillos (ibidy GMBH, Martinsried, Alemania) (Figura 11).



Figura 11. Detalle de una placa hidrofóbica de 2x4 pocillos para visualización mediante CLSM.

Antes del inicio de cada experimento en cuestión se procedió a la descongelación, siembra e incubación de las micobacterias en placas de agar Middlebrook 7H10 (7H10) (BD, Estados Unidos), comprobando la pureza del aislamiento en cada caso. Una vez crecidas, las micobacterias se resuspendieron en tampón fosfato salino (PBS) (bioMérieux, Francia) hasta alcanzar una concentración de 0,5 MacFarland (McF) (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) mediante turbidimetría (DensiCHEK™ plus Instrument, bioMérieux, Francia). En cada pocillo se adicionaron 0,3 mL de la suspensión preparada anteriormente, incubándose la placa a 37°C en 5% CO_2 durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se retiró la suspensión y se lavó una vez cada pocillo con PBS. Finalmente se añadieron 0,3 mL de medio líquido Middlebrook 7H9 (7H9) (BD, Estados Unidos) y la placa se incubó a 37°C a 80rpm durante 4 días.

Antes de iniciar los experimentos, se comprobó que todo el material y reactivos no emitían autofluorescencia *per se*. Las placas se examinaron durante ese período de tiempo y se

renovó el medio 7H9 diariamente. Todos los experimentos se repitieron un total de 3 veces por cada cepa.

Una de las filas de la placa fue empleada para estudiar la autofluorescencia intrínseca junto con la tinción Nile Red[®] (Sigma-Aldrich Co., St.Louis, MO), y la otra fila para analizar la proporción de micobacterias vivas y muertas con la tinción Live/Dead BackLight[®] (Invitrogen, Estados Unidos). Las tinciones fueron realizadas de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. Más específicamente, la tinción Live/Dead BackLight[®] fue preparada con los reactivos del kit L7012. 3 µl del componente A y 3 µl del componente B se mezclaron con 1 ml de agua destilada estéril. Tras mezclar dicha solución, se añadieron 25 µl a cada pocillo. Las placas con la tinción se incubaron durante 15 minutos en oscuridad, a temperatura ambiente y en cámara húmeda, y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril.

Las placas se analizaron utilizando un microscopio confocal láser de barrido (CLSM) Leica DM IRB (Leica, Alemania). Las placas se observaron con el objetivo de inmersión HCX PL APO lambda blue 63,0 x 1,40 OIL UV, y se emplearon diferentes láseres en función del parámetro a estudiar (Tabla 6).

Tabla 6. Datos de los espectros de excitación y emisión empleados en el CLSM.

Parámetros	Excitación (nm)	Emisión (nm)	Características
Autofluorescencia	Diode 405	450-480	Fluorescencia emitida por las propias células bacterianas (azul en las MNPCR estudiadas)
Nile Red [®]	HeNe 543	600-650	Molécula hidrofóbica fotoestable que se une a los lípidos de células bacterianas y emite fluorescencia roja en ambientes hidrofóbicos
Live/Dead BackLight [®]	Argon 488	Fluorescencia verde: 500-550	La fluorescencia verde es emitida por células vivas
		Fluorescencia roja: 610-670	La fluorescencia roja es emitida por células muertas

La superficie cubierta se estudió tomando 24 microfotografías de cada cepa y tiempo, empleando un ZOOM 1. Las fotografías obtenidas se analizaron con el software Image J (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, Estados Unidos).

El espesor de la biopelícula se midió en ocho puntos aleatorios de cada pocillo, utilizando un ZOOM 2.

La variable autofluorescencia fue analizada como el porcentaje de fluorescencia relacionada con el número de células bacterianas detectadas con la tinción Nile Red[®] empleando la Fórmula 1.

$$\frac{\% \text{ autofluorescencia de superficie cubierta}}{\% \text{ Nile Red de superficie cubierta}} \times 100$$

Fórmula 1. Cálculo de la variable autofluorescencia.

La variable superficie cubierta se calculó a partir de los resultados obtenidos mediante la tinción Nile Red[®], según la Fórmula 2.

$$\text{Media Nile Red} \pm \text{DS} (\%)$$

Fórmula 2. Cálculo de la variable superficie cubierta.

Para analizar el porcentaje de bacterias muertas se emplearon los resultados obtenidos con la tinción Live/Dead BackLight[®], según la Fórmula 3.

$$\frac{\% \text{ bacterias muertas (fluorescencia roja)}}{\text{Total de bacterias vivas y muertas}} \times 100$$

Fórmula 3. Cálculo del porcentaje de bacterias muertas.

Las medidas de espesor obtenidas tanto en los pocillos teñidos con Nile Red[®] como con la tinción Live/Dead BackLight[®] se expresaron como se muestra en la Fórmula 4.

$$\text{Media Espesores} \pm \text{DS} (\mu\text{m})$$

Fórmula 4. Cálculo de la variable espesor.

Se evaluó el efecto del tiempo y de la especie en los valores de autofluorescencia, porcentaje de superficie cubierta, porcentaje de bacterias muertas y espesor. Para ello se usaron modelos lineales de efectos mixtos, en los que el tiempo fue tomado como variable cuantitativa y la especie con variable cualitativa nominal. Para las comparaciones entre especies se tomó como referencia *M. abscessus*. Los modelos estimados incluyeron efectos fijos para la especie y el tiempo así como efectos aleatorios para el tiempo. La significación estadística de los efectos fijos fue contrastada mediante el test de la *F* del análisis de la varianza (ANOVA). El análisis estadístico fue llevado a cabo utilizando la librería NLME (*Linear and nonlinear mixed effects models*) implementada en el paquete estadístico R¹⁶.

La puesta a punto de esta técnica para el análisis de MNPCR, no descrita previamente, fue publicada en el año 2013³³¹.

4.3. Estudio de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima de erradicación de biopelículas de MNPCR frente a diferentes antimicrobianos.

4.3.1. Estudio de CMIs

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de las diferentes cepas de MNPCR fue estudiada por triplicado mediante la técnica estandarizada de microdilución en caldo para micobacterias de crecimiento rápido (MCR) indicada por el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)¹⁷.

De entre los nueve antimicrobianos recomendados en el CLSI para MCR (amicacina, cefoxitina, imipenem, cotrimoxazol, claritromicina, ciprofloxacino, doxiciclina, linezolid y tobramicina), los antibióticos utilizados para los estudios de sensibilidad fueron ciprofloxacino (Sigma, Alemania), claritromicina (Sigma, Alemania) y amicacina (Sigma, Alemania) debido a su elección generalizada en infecciones producidas por las MNPCR estudiadas. Todos los antibióticos se prepararon conforme a las normas del CLSI, y se mantuvieron conservados a 80°C en alícuotas.

Las CMIs fueron determinadas empleando concentraciones seriadas de los antimicrobianos amicacina (1-128 mg/L), ciprofloxacino (0,125-16 mg/L) y claritromicina (0,06-64 mg/L) en

microplacas estériles P-96 (Corning, Estados Unidos). Cada placa además contenía dos pocillos para el control de crecimiento, y dos pocillos para el control de esterilidad del medio con caldo Mueller-Hinton II (MH-II) sin bacteria.

Procedimiento:

1. Cultivar las micobacterias en placas de agar sangre e incubar a 37°C en atmósfera CO₂. Las placas empleadas fueron Triptosa-Soja + 5% sangre de cordero (TSS) (bioMérieux, Francia).
2. Preparar una suspensión 0,5 McF ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) directamente de las placas en MH-II suplementado con cationes (Difco, Detroit, MI), utilizando perlas de cristal estériles (5-7 perlas de 3 mm), y mezclar mediante vórtex.
3. Añadir 0,5 mL de la suspensión (2) a 4,5 mL de agua destilada estéril (dilución 1:10) = $1,5 \times 10^7$ UFC/mL y mezclar.
4. Añadir 4 mL del paso (3) a 36 mL de agua destilada estéril (dilución 1:10) = $1,5 \times 10^6$ UFC/mL.
5. Inocular 0,01 mL del paso (4) a placas P-96 con 0,1 mL de antibiótico y MH-II (dilución 1:10) = $1,5 \times 10^5$ UFC/mL.
6. Incubar a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ y observar las placas a las 72h (hasta un máximo de 5 días).

Se realizaron controles de calidad de las placas de antibióticos con las cepas *S. aureus* ATCC 29213 y *M. peregrinum* ATCC 700686, como sugiere el protocolo del CLSI.

4.3.2. Estudio de CMEBs

Para determinar la concentración mínima de erradicación de la biopelícula (CMEB), la biopelícula se desarrolló por triplicado siguiendo el protocolo basado en el **sistema de Calgary** (*Calgary Biofilm Device*; CBD)¹⁸ usando las placas de 96 pocillos MBECTM *Biofilm Inoculator* (Innovotech, Canadá). Estas placas contienen en la tapa unas proyecciones de material plástico sobre las que se va a formar la biopelícula tras sumergirlas en el inóculo bacteriano (Figura 12).



Figura 12. Detalle de una placa MBEC™ *Biofilm Inoculator*.

Procedimiento:

1. Preparar una suspensión 0,5 McF ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) en 7H9 utilizando perlas de cristal estériles (5-7 perlas de 3 mm) y mezclando mediante vórtex.
2. Añadir 0,2 mL de la suspensión (1) a cada pocillo (placa de 96 pocillos) y dejar que se forme la biopelícula durante 96h en estufa de 37°C en agitación (80 rpm). Poner 2-3 controles de crecimiento en la misma. Adicionalmente, realizar recuentos para la comprobación del inóculo.
3. Lavar las placas con PBS y enfrentarlas durante 48h a concentraciones seriadas (0,03-4096 mg/L) de los antibióticos amicacina, claritromicina y ciprofloxacino (MH-II) pasando la tapa de la placa MBEC™ *Biofilm Inoculator* a una placa P-96 en la que previamente se habían preparado las diluciones seriadas correspondientes, a un volumen de 200 µL/pocillo.
4. Lavar las placas con PBS dos veces y sonicar las mismas 5 minutos en una placa P-96 con 7H9. Incubar a 37°C.
5. Lectura visual de la CMEB a los 7 días como si de una CMI convencional se tratara.

4.4. Estudio del efecto de antibióticos en la estructura de biopelículas de MNPCR mediante microscopía confocal láser de barrido

Las concentraciones de antibióticos utilizadas para los estudios de análisis estructural mediante CLSM se eligieron tomando como base los valores de referencia del CLSI¹⁷ para la interpretación de CMIs en MCR (Tabla 7). Las concentraciones empleadas fueron las siguientes: ciprofloxacino (1 mg/L), claritromicina (2 mg/L) y ampicilina (16 mg/L). Todos los antibióticos se prepararon conforme a las normas del CLSI, y se mantuvieron conservados a 80°C en alícuotas hasta el comienzo del estudio.

El efecto de cada antibiótico en biopelículas formadas por las cepas tipo *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. smegmatis* se estudió en placas hidrofóbicas ibidy de 2x4 pocillos a diferentes tiempos (24, 48, 72h), adicionando 0,3 mL/pocillo de antibiótico en función del tiempo, y usando un pocillo sin antibióticos como control (96h) al que se adicionó 0,3 mL de medio 7H9 (BD, Estados Unidos).

Tabla 7. Valores de referencia del CLSI para la interpretación de CMIs en MCR.

Antibiótico	Sensible	Intermedio	Resistente
Ciprofloxacino	≤1	2	≥4
Claritromicina	≤2	4	≥8
Ampicilina	≤16	32	≥64

La metodología empleada es igual a la descrita en el punto 4.2. (Análisis estructural mediante CLSM). Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada cepa.

Las especies se estudiaron de forma independiente, y los valores de autofluorescencia, porcentaje de superficie cubierta, porcentaje de bacterias muertas y espesores se compararon por parejas e intraespecie en función del tiempo de adición del antibiótico (24, 48, 72h) y con el control sin antibiótico. Para ver si existían diferencias significativas, el estudio estadístico se realizó empleando la versión 3.5.1. del programa EPI-INFO (Centers for Disease Control and

Prevention, Atlanta, GA). Se realizaron comparaciones dos a dos utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney/Wilcoxon con un nivel de significación estadística del 0,05.

4.5. Estudio de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima de erradicación de biopelículas de MNPCR frente a diferentes agentes antibiopelícula y combinación de antibióticos y agentes antibiopelícula.

4.5.1. Estudio de CMI

Se realizó el test de microdilución en caldo por triplicado para determinar la CMI de los agentes antibiopelícula siguiendo el protocolo indicado por el CLSI¹⁷ anteriormente descrito (véase página 68) con el objetivo de determinar las concentraciones con las que posteriormente se iban a realizar los ensayos con las biopelículas. Las CMI fueron determinadas empleando concentraciones seriadas de los detergentes NAC (0,03-4096 mg/L) (Sigma, Alemania) y Tween 80 (0-40%) (BD, Estados Unidos).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada cepa.

4.5.2. Estudio de CMEBs

Al igual que el protocolo anteriormente descrito (véase página 69), la determinación de la CMEB para las combinaciones de los distintos compuestos se realizó por triplicado mediante la técnica CBD utilizando las placas MBECTM *Biofilm Inoculator* y siguiendo el mismo protocolo de inoculación.

La preparación de las placas con los compuestos para exponer las biopelículas se realizó, en este caso, preparando diluciones seriadas de los antibióticos amicacina, claritromicina y ciprofloxacino (MH-II) al doble de concentración (0,06-8192 mg/L) y a un volumen de 100 µL/pocillo. Posteriormente se añadieron 100 µL del doble de la concentración de NAC (1024 mg/L) o de Tween 80 (1%), según correspondiese al ensayo, siendo el volumen final por pocillo de 200 µL.

Tras exponer las biopelículas a estas combinaciones se procedió con el protocolo de acuerdo a lo indicado en la página 69. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada cepa.

Posteriormente se compararon los resultados en la estructura de la biopelícula (CMEBs) obtenidos para amicacina, claritromicina y ciprofloxacino (siguiendo el procedimiento descrito en el punto 4.3.2.) con los correspondientes a las combinaciones de éstos con NAC o Tween (siguiendo el procedimiento descrito en el punto 4.5.2.), analizando la presencia de posibles diferencias.

4.6. Estudio del efecto de la combinación de antibióticos y agentes antibiopelícula en la estructura de biopelículas de MNPCR mediante microscopía confocal láser de barrido

Las concentraciones finales de antibióticos y agentes antibiopelícula utilizadas para los estudios de análisis estructural mediante CLSM fueron las siguientes: ciprofloxacino (1 mg/L), claritromicina (2 mg/L), amicacina (16 mg/L), NAC (512 mg/L) y Tween 80 (0,5%). Todos ellos se prepararon al doble de la concentración deseada, y se mantuvieron conservados a 80°C en alícuotas.

El efecto de cada antibiótico en combinación con cada agente antibiopelícula en biopelículas formadas por las cepas tipo *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. chelonae* y *M. smegmatis* se estudió en placas hidrofóbicas ibidy de 2x4 pocillos a diferentes tiempos (24, 48, 72h), adicionando 150 µL/pocillo de antibiótico y 150 µL/pocillo de agente antibiopelícula en función del tiempo, siendo el volumen final 0,3 mL/pocillo. Se empleó un pocillo sin antibióticos ni agentes antibiopelícula como control (96h) al que se adicionó 0,3 mL de medio 7H9 (BD, Estados Unidos). Estas concentraciones se eligieron tomando como base los valores de referencia del CLSI¹⁷. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada cepa.

El análisis estructural del efecto de antibióticos y combinaciones de los mismos con agentes antibiopelícula se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito en el punto 4.2. (Análisis estructural mediante CLSM), excepto que para este análisis la superficie cubierta se estudió tomando 96 microfotografías de cada cepa y tiempo.

Las especies se estudiaron de forma independiente, y los valores de autofluorescencia, porcentaje de superficie cubierta, porcentaje de bacterias muertas y espesores se compararon por parejas e intraespecie en función del tiempo de adición del antibiótico y agente antibiopelícula (24, 48, 72h) y con el control (96h). Para ver si existían diferencias significativas, el estudio estadístico se realizó empleando la versión 3.5.1. del programa EPI-INFO, eligiendo el test no paramétrico Mann-Whitney con un nivel de significancia estadística del 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Análisis estructural mediante microscopía confocal láser de barrido

5.1.1. Modelos ajustados

Las Tablas 8-11 muestran un resumen de los modelos ajustados. Los efectos fijos se resumen mediante los coeficientes estimados, sus errores estándar y los valores p correspondientes a los contrastes de hipótesis relativos a cada coeficiente. Estas medidas se muestran en las columnas llamadas B , Se y p respectivamente. El coeficiente estimado para el tiempo es una pendiente que indica el cambio medio en la variable dependiente por cada incremento de una hora en el tiempo. Los coeficientes estimados para las especies indican la diferencia entre los valores medios de la respuesta de cada especie y la tomada como referencia (*M. abscessus*). Los efectos aleatorios se describen mediante las desviaciones estándar de las constantes ($\sigma_{\text{constante}}$), las pendientes (σ_{tiempo}) y los errores del modelo (σ_{residuos}). Estas medidas se muestran en la columna llamada estimación dentro de la parte de la tabla relativa a los efectos aleatorios.

Tabla 8. Resumen del modelo ajustado estadístico para la autofluorescencia.

Efectos fijos				Efectos aleatorios	
Variable	B	Se	p	Parámetro	Estimación
Constante	41,71	29,49	0,1623	$\sigma_{\text{constante}}$	4,38e ⁻⁰⁵
Tiempo	0,45	0,31	0,1618	σ_{tiempo}	0,19
Especies			0,3563	σ_{residuos}	76,48
<i>M. chelonae</i>	12,49	32,13			
<i>M. fortuitum</i>	10,31	32,60			
<i>M. mageritense</i>	-26,81	32,60			
<i>M. mucogenicum</i>	-52,25	32,60			
<i>M. peregrinum</i>	-13,37	32,60			
<i>M. smegmatis</i>	13,61	32,60			

Tabla 9. Resumen del modelo ajustado estadístico para el porcentaje de superficie cubierta.

Efectos fijos				Efectos aleatorios	
Variable	<i>B</i>	<i>Se</i>	<i>p</i>	Parámetro	Estimación
Constante	19,97	6,00	0,0015	$\sigma_{\text{constante}}$	6,78
Tiempo	0,02	0,05	0,7547	σ_{tiempo}	$6,04e^{-05}$
Especies			<0,0001	σ_{residuos}	1,26
<i>M. chelonae</i>	-16,95	6,43	0,0105*		
<i>M. fortuitum</i>	27,39	7,42	0,0024*		
<i>M. mageritense</i>	20,54	7,42	0,0151*		
<i>M. mucogenicum</i>	9,74	7,42	0,2106*		
<i>M. peregrinum</i>	10,39	7,42	0,1834*		
<i>M. smegmatis</i>	-3,88	7,42	0,6094*		

*Comparación con *M. abscessus***Tabla 10.** Resumen del modelo ajustado estadístico para el porcentaje de bacterias muertas.

Efectos fijos				Efectos aleatorios	
Variable	<i>B</i>	<i>Se</i>	<i>p</i>	Parámetro	Estimación
Constante	12,15	3,65	0,0008	$\sigma_{\text{constante}}$	2,35
Tiempo	-0,15	0,04	<0,0001	σ_{tiempo}	$2,96e^{-09}$
Especies			0,5961	σ_{residuos}	9,00
<i>M. chelonae</i>	2,69	3,97			
<i>M. fortuitum</i>	4,87	4,14			
<i>M. mageritense</i>	-2,57	4,14			
<i>M. mucogenicum</i>	2,77	4,14			
<i>M. peregrinum</i>	1,35	4,14			
<i>M. smegmatis</i>	-0,59	4,14			

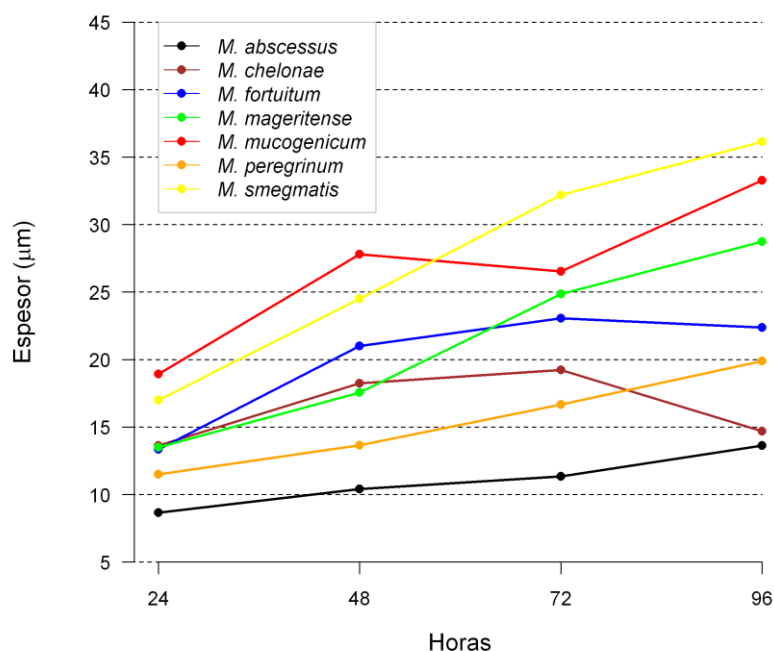
Tabla 11. Resumen del modelo ajustado estadístico para el espesor.

Efectos fijos				Efectos aleatorios	
Variable	B	Se	p	Parámetro	Estimación
Constante	2,55	0,68	0,0002	$\sigma_{\text{constante}}$	0,16
Tiempo	0,14	0,01	<0,0001	σ_{tiempo}	0,02
Especies			<0,0001	σ_{residuos}	7,18
<i>M. chelonae</i>	5,44	0,73	<0,0001*		
<i>M. fortuitum</i>	8,93	0,73	<0,0001*		
<i>M. mageritense</i>	10,16	0,73	<0,0001*		
<i>M. mucogenicum</i>	15,62	0,73	<0,0001*		
<i>M. peregrinum</i>	4,41	0,73	<0,0001*		
<i>M. smegmatis</i>	16,45	0,73	<0,0001*		

*Comparación con *M. abscessus*

5.1.2. Análisis de espesores

En la Figura 13 se muestran los valores medios de espesor en biopelículas de MNPCR a lo largo del tiempo (24-96h).

**Figura 13.** Espesor medio en biopelículas de MNPCR.

M. fortuitum y *M. chelonae* alcanzaron el máximo espesor a las 72 h ($23,11 \pm 4,35 \mu\text{m}$; $19,24 \pm 5,02 \mu\text{m}$, respectivamente), mientras que *M. abscessus*, *M. mageritense*, *M. mucogenicum*,

M. peregrinum y *M. smegmatis* al final del experimento, a las 96 h ($13,64 \pm 6,22 \mu\text{m}$; $28,75 \pm 11,85 \mu\text{m}$; $33,26 \pm 11,93 \mu\text{m}$; $19,89 \pm 3,87 \mu\text{m}$; $36,36 \pm 10,83 \mu\text{m}$, respectivamente).

El modelo estimado para el espesor indica que tanto el tiempo como el tipo de especie tienen un efecto relevante. Los valores p obtenidos para ambos factores a partir del test F de ANOVA son inferiores a 0,0001. El coeficiente estimado β para el tiempo indica que por cada hora adicional se espera un incremento medio de 0,14 en el espesor. Todos coeficientes estimados β para las diferentes especies son positivos, mostrando que *M. abscessus* presenta un espesor de media inferior al resto de MNPCR (Tabla 11).

5.1.3. Análisis del porcentaje de superficie cubierta

❖ Crecimiento uniforme:

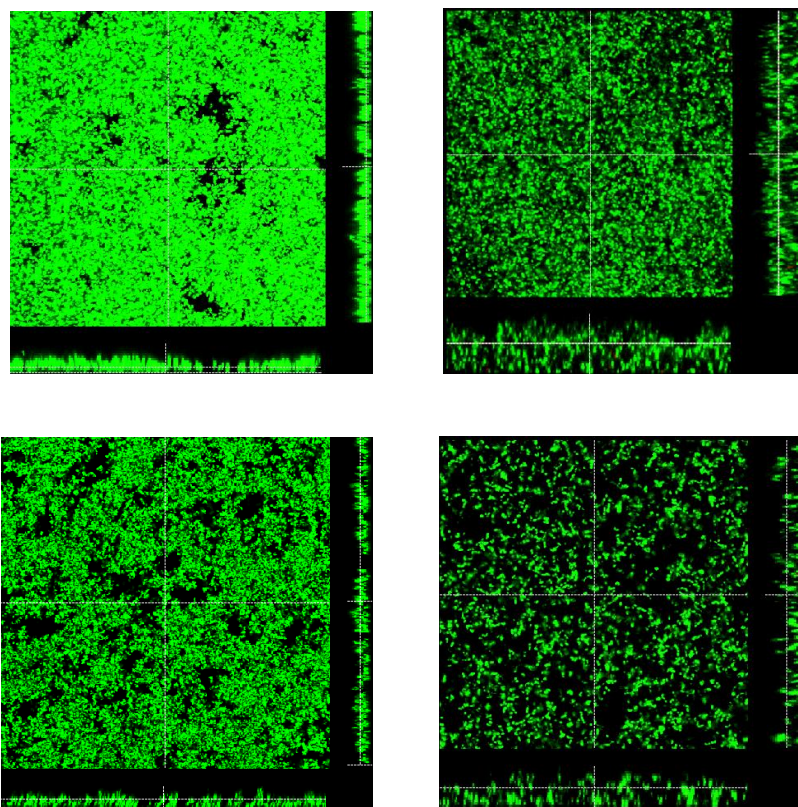


Figura 14. Biopelículas de *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum* y *M. mageritense* (tinción Live/Dead BackLight®).

a) Biopelícula de *M. abscessus*

b) Biopelícula de *M. fortuitum*

c) Biopelícula de *M. peregrinum*

d) Biopelícula de *M. mageritense*

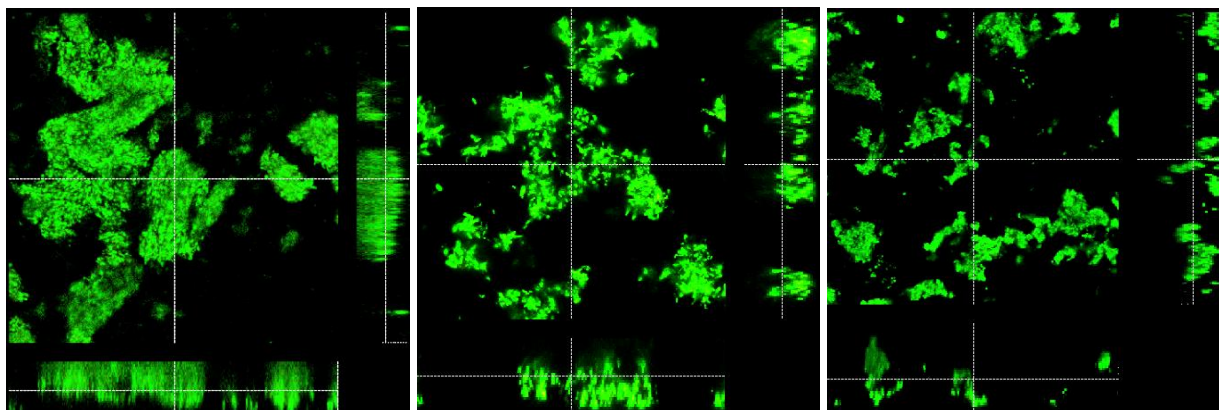
❖ Crecimiento irregular:

Figura 15. Biopelículas de *M. chelonae*, *M. smegmatis* y *M. mucogenicum* (tinción Live/Dead BackLight®).

a) Biopelícula de *M. chelonae*

b) Biopelícula de *M. smegmatis*

c) Biopelícula de *M. mucogenicum*

En la Figura 16 se muestran los valores medios de porcentaje de superficie cubierta en biopelículas de MNPCR a lo largo del tiempo (24-96h).

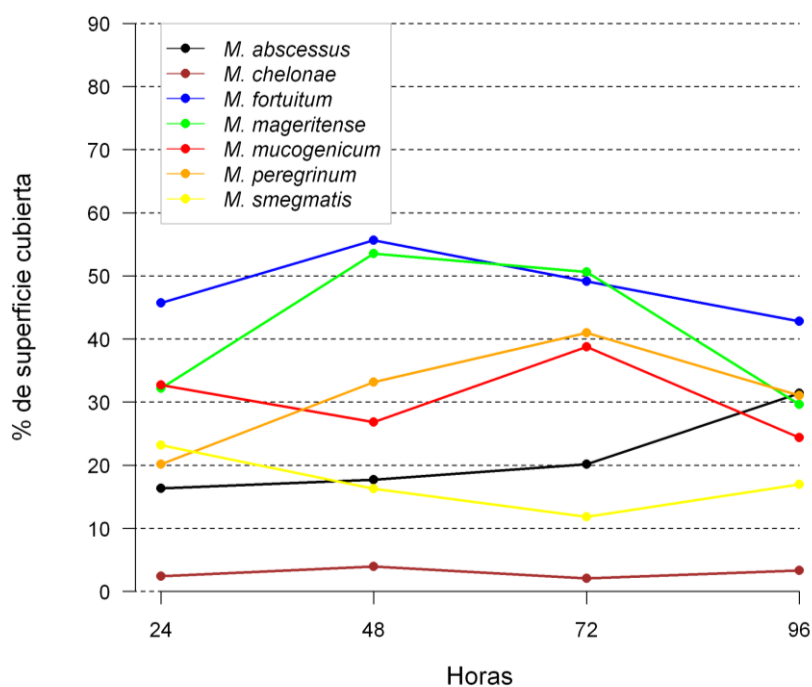


Figura 16. Porcentaje medio de superficie cubierta en biopelículas de MNPCR.

El modelo estimado para el porcentaje de superficie cubierta muestra que el tiempo no es un factor relevante pero sí lo es el tipo de especie. Los valores p obtenidos con el test F de ANOVA son 0,7547 para el tiempo y menor de 0,0001 para la especie. Los coeficientes estimados β para las especies indican que al hacer la comparación con *M. abscessus*, el valor medio del porcentaje de superficie cubierta es menor para *M. chelonae*, y mayor para *M. fortuitum* y *M. mageritense* (Tabla 9).

M. chelonae crece verticalmente cuando se encuentra formando parte de una biopelícula, mientras que otras especies como *M. abscessus* cubren toda la superficie del pocillo con un menor espesor (Figura 17).

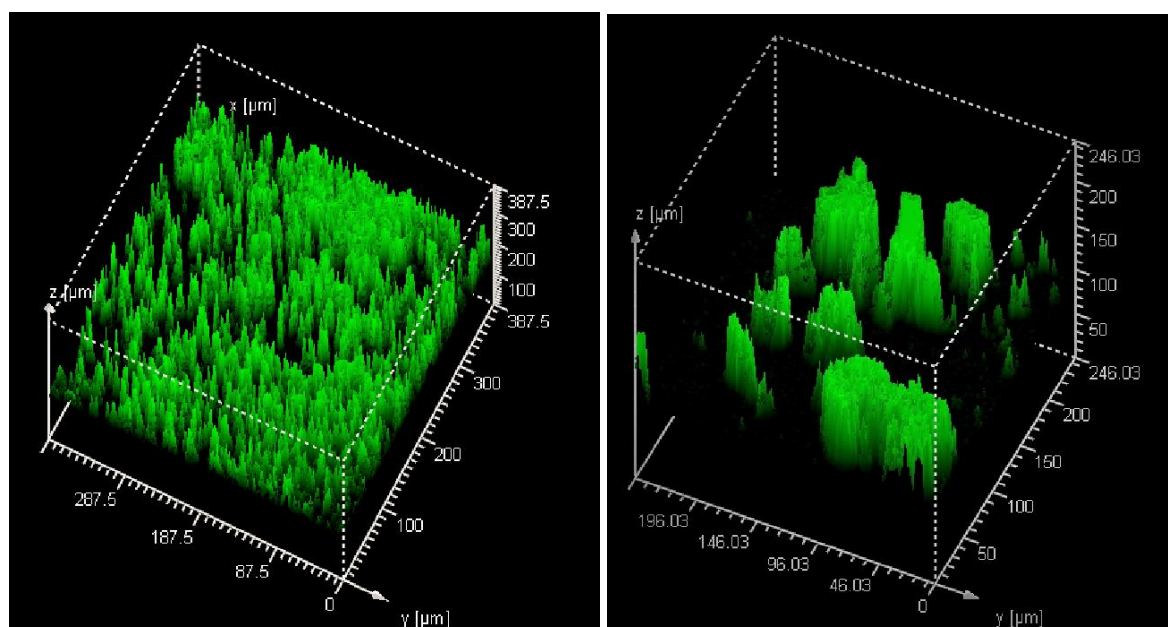


Figura 17. Reconstrucción 3D de imágenes mediante CLSM (48h) (tinción Live/Dead Backlight[®]).

a) Biopelícula de *M. abscessus*

b) Biopelícula de *M. chelonae*

En las Figuras 18-21 se muestran la presencia de cordones en los casos de *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. mucogenicum* y *M. smegmatis*.

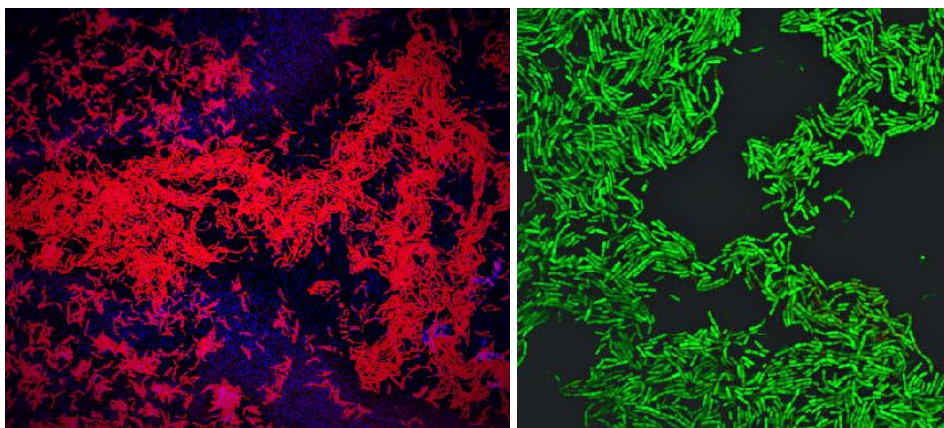


Figura 18. Cordones de *M. abscessus* a las 24 h.

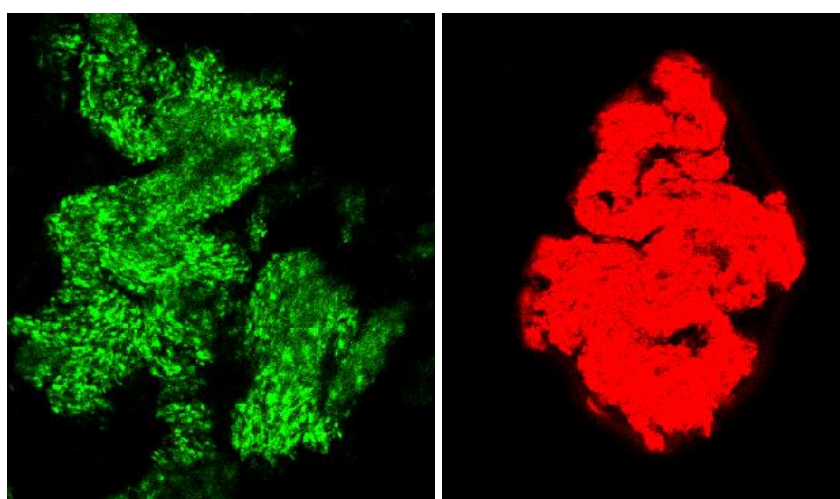


Figura 19. Cordones de *M. chelonae* a las 72h y a las 96h.

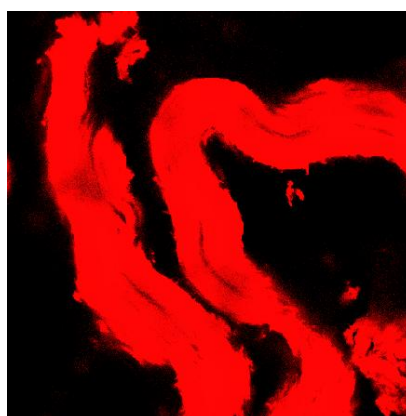


Figura 20. Cordones de *M. mucogenicum* a las 96h.

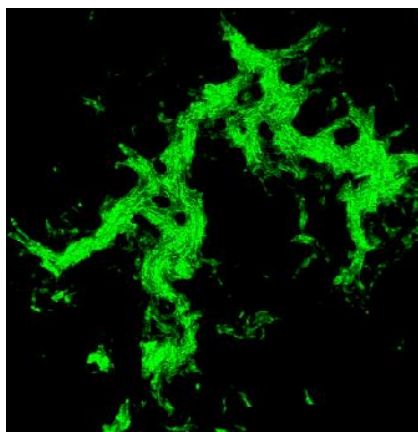


Figura 21. Cordones de *M. smegmatis* a las 24 h.

El mayor valor de porcentaje de superficie cubierta corresponde a *M. fortuitum* ($55,67 \pm 23,73\%$), que fue alcanzado a las 48h. El resto de micobacterias alcanzaron su máximo porcentaje de superficie cubierta a las 24h (*M. smegmatis*), 48h (*M. chelonae*, *M. mageritense*), 72h (*M. peregrinum* y *M. mucogenicum*) y 96h (*M. abscessus*). En las Figuras 22-23 se muestran imágenes de superficie cubierta a las 96h de las siete cepas de MNPCR estudiadas.

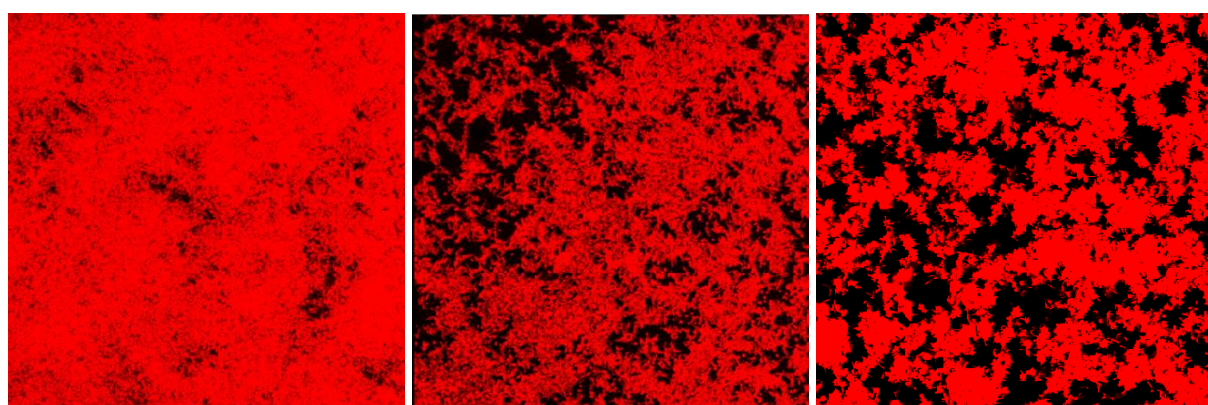


Figura 22. Superficie cubierta de *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. peregrinum* mediante CLSM.

a) Superficie cubierta a 96h de
M. fortuitum ($46,13 \pm 12,02\%$)

b) Superficie cubierta a 96h de
M. abscessus ($31,4 \pm 26,41\%$)

c) Superficie cubierta a 96h de
M. peregrinum ($31,03 \pm 8,01\%$)

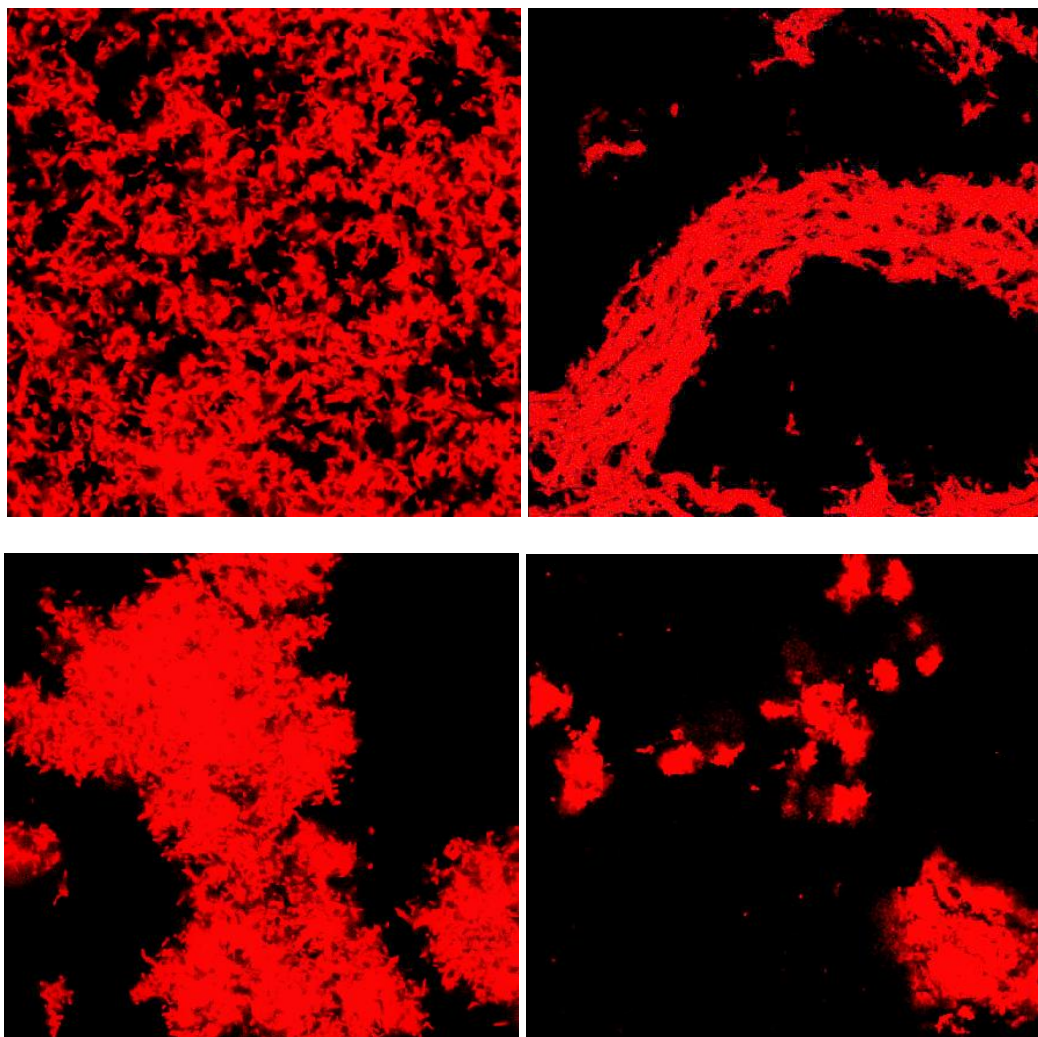


Figura 23. Superficie cubierta de *M. mageritense*, *M. mucogenicum*, *M. smegmatis* y *M. chelonae* mediante CLSM.

a) Superficie cubierta de <i>M. mageritense</i> a las 96h ($29,60 \pm 3,23\%$)	b) Superficie cubierta de <i>M. mucogenicum</i> a las 96h ($24,37 \pm 7,23\%$)
c) Superficie cubierta de <i>M. smegmatis</i> a las 96h ($16,97 \pm 6,64\%$)	d) Superficie cubierta de <i>M. chelonae</i> a las 96h ($3,33 \pm 1,54\%$)

Cuando la biopelícula de todas las cepas alcanza su madurez tiende a desprenderse parcialmente, un hecho que podría explicar estos resultados.

5.1.4. Análisis del porcentaje de autofluorescencia total

En la Figura 24 se muestran los valores medios de porcentaje de autofluorescencia en biopelículas de MNPCR a lo largo del tiempo (24-96h).

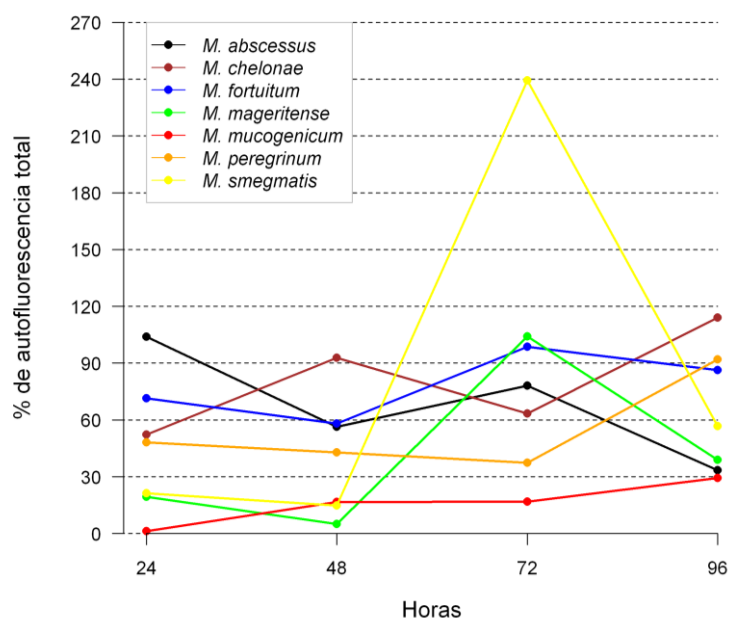


Figura 24. Porcentaje medio de autofluorescencia en biopelículas de MNPCR.

Los resultados para la autofluorescencia indican que ni el tiempo ni la especie tienen un efecto significativo. Los valores p obtenidos a partir del test F de ANOVA son 0,1618 y 0,3563 para el tiempo y la especie respectivamente. La gran desviación estándar del error aleatorio (Se) para este modelo es notable (Tabla 8).

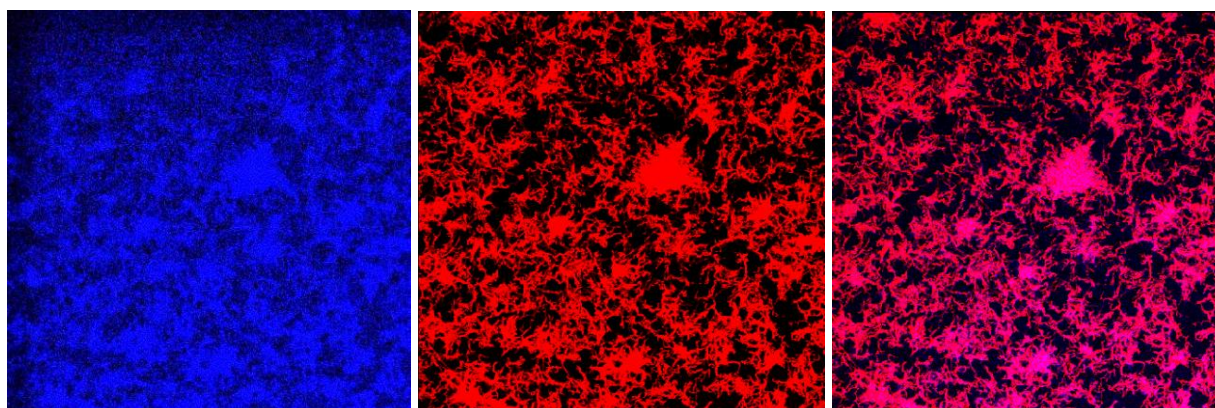


Figura 25. Biopelícula de *M. fortuitum* a las 24h.

a) Autofluorescencia

b) Tinción Nile Red[®]

c) Superposición a) y b)

Se puede confirmar que la fluorescencia azul emitida es específica de las MNPCR estudiadas ya que existe concordancia entre las bacterias teñidas con Nile Red[®] (tinción específica de lípidos de las células bacterianas) y aquellas que emiten autofluorescencia (Figuras 25-26).

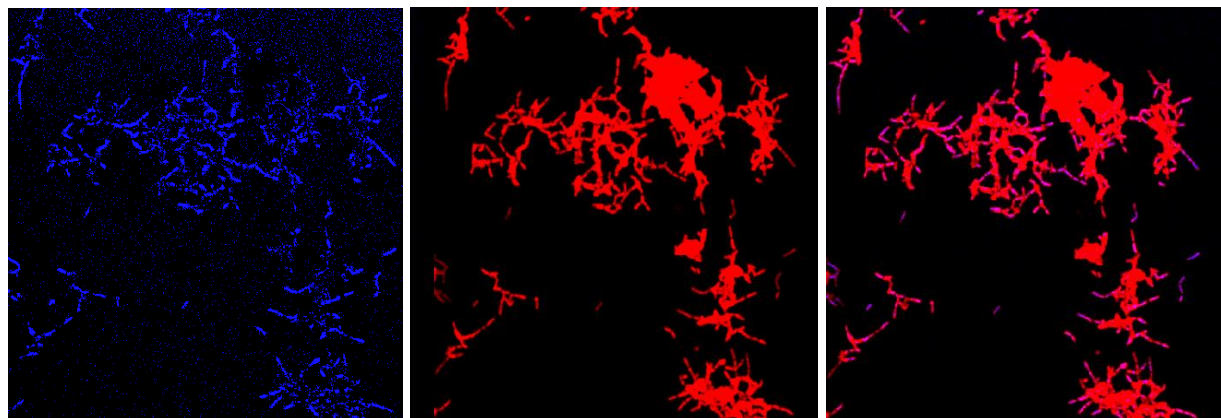


Figura 26. Biopelícula de *M. smegmatis* tratada 72h con amicacina.

a) Autofluorescencia

b) Tinción Nile Red[®]

c) Superposición a) y b)

M. fortuitum, *M. abscessus*, *M. mucogenicum*, *M. mageritense* y *M. peregrinum* presentaron menores valores de autofluorescencia cuando el porcentaje de superficie cubierta es mayor, al contrario que sucede con *M. chelonae* y *M. smegmatis* (Figura 27).

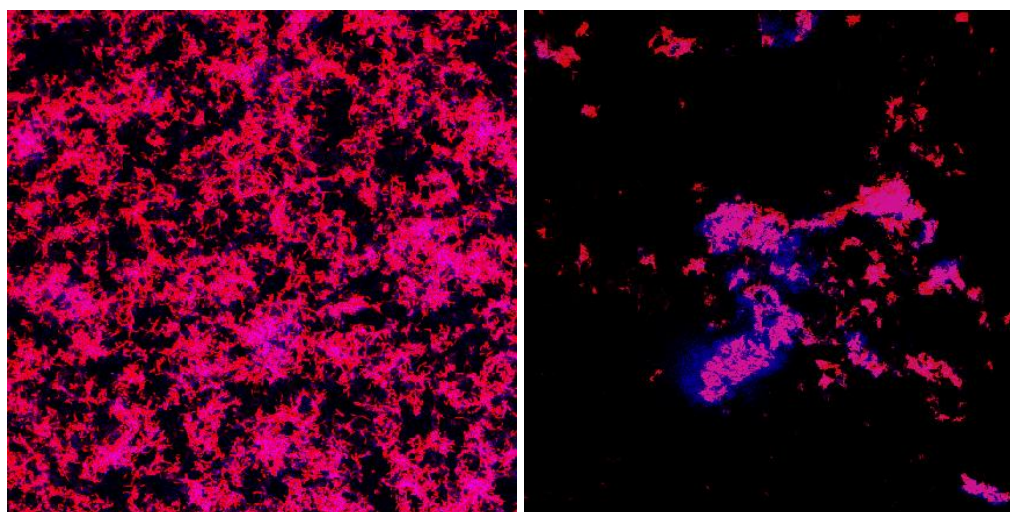


Figura 27. Superposición de autofluorescencia y Nile Red[®] en biopelículas de *M. fortuitum* y *M. chelonae*.

a) Biopelícula de *M. fortuitum*

b) Biopelícula de *M. chelonae*

Se detectó la presencia de autofluorescencia fuera de la estructura bacteriana en algunas especies, con una distribución irregular dentro de la biopelícula (Figuras 28-29). Este fenómeno lo presentaron después de 24h de incubación *M. abscessus*, *M. mageritense*, *M. mucogenicum* y *M. smegmatis*, mientras que *M. chelonae*, *M. peregrinum* y *M. fortuitum* al cabo de 24 y 48h.

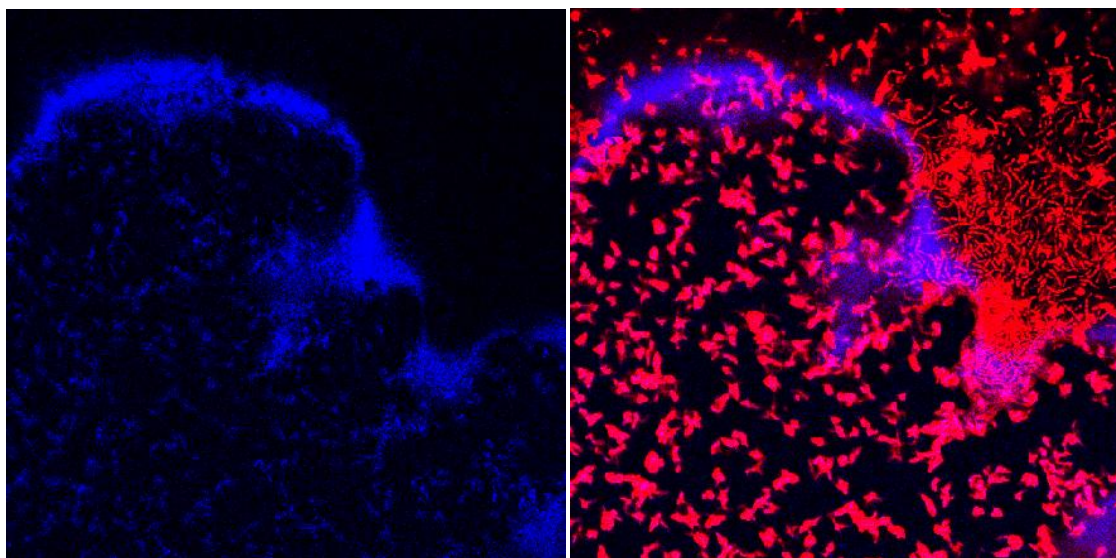


Figura 28. Autofluorescencia extracelular en biopelícula de *M. abscessus* a las 24h.

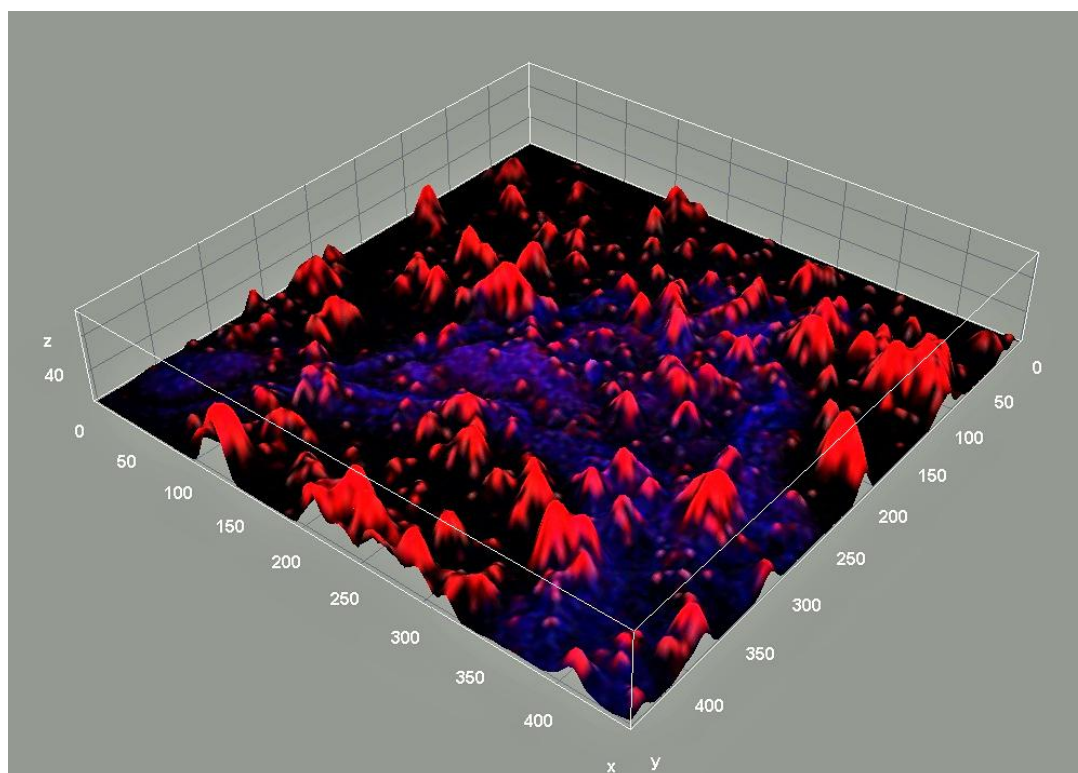


Figura 29. Reconstrucción 3D: biopelícula de *M. fortuitum* (tinción Nile Red® y autofluorescencia).

5.1.5. Análisis del porcentaje de bacterias muertas

En la Figura 30 se muestran los valores medios de porcentaje de bacterias muertas en biopelículas de MNPCR a lo largo del tiempo (24-96h).

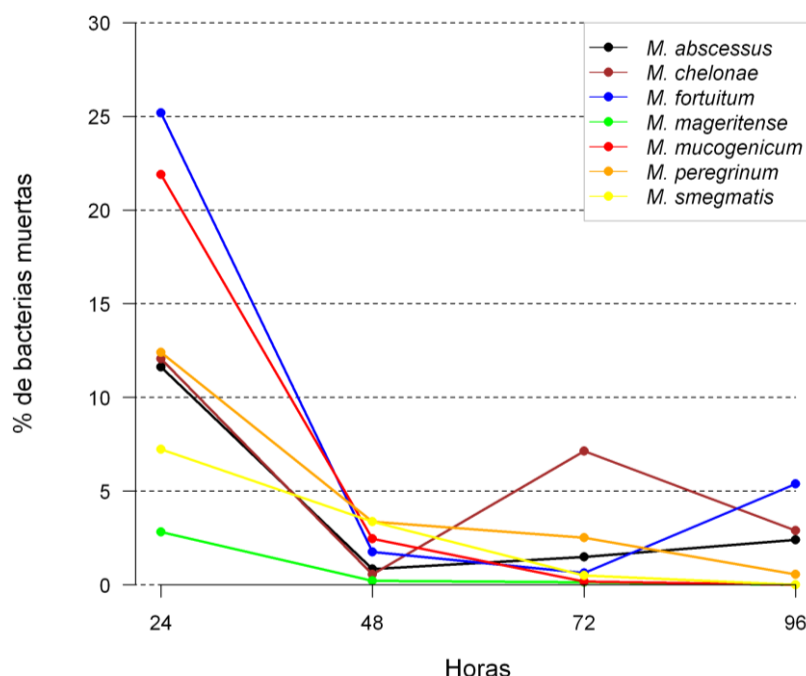


Figura 30. Porcentaje medio de bacterias muertas en biopelículas de MNPCR.

La tinción Live/Dead BackLight[®] demostró que la mayoría de las bacterias estaban vivas durante el desarrollo de la biopelícula.

El mayor porcentaje de bacterias muertas se detectó en todas las micobacterias después de 24h de inoculación (Figura 31).

El análisis relativo al porcentaje de bacterias muertas muestra un efecto significativo para el tiempo pero no para el tipo de especie. A partir del test F de ANOVA se obtiene un valor p inferior a 0,0001 para el tiempo y un valor p igual a 0,5961 para la especie. El coeficiente estimado β para el tiempo indica una reducción media de 0,15 en el porcentaje de bacterias muertas por cada hora adicional (Tabla 10).

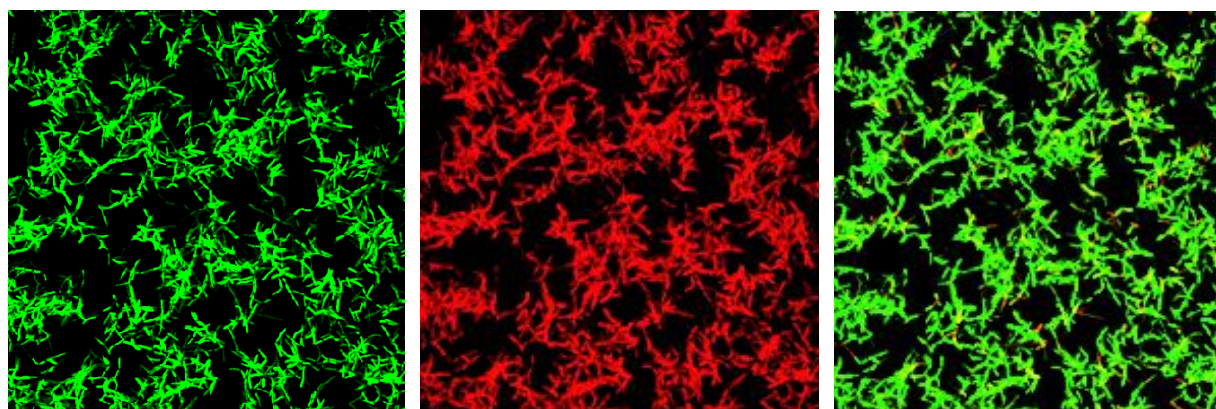


Figura 31. Biopelícula de *M. mageritense* a las 24h (tinción Live/Dead BackLight[®]).

a) Bacterias vivas

b) Bacterias muertas

c) Superposición a) y b)

5.2. Estudio de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima de erradicación de biopelículas de MNPCR frente a diferentes antimicrobianos.

Los resultados de CMI y CMEB se especifican en la Tabla 12.

Tabla 12. Valores de CMI y CMEB para las diferentes especies de MNPCR y los antibióticos ciprofloxacino (CIP), claritromicina (CLR) y amicacina (AN).

		<i>M. abscessus</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. smegmatis</i>
CMI (mg/L)	CIP	2	0,06	0,5	2	0,5	0,12	0,25
	CLR	0,03	1	2	<0,03	8	<0,03	2
	AN	8	1	4	1	8	<1	<1
CMEB (mg/L)	CIP	1024	256	512	256	1024	4096	512
	CLR	4096	4096	>4096	2048	2048	4096	4096
	AN	4096	>4096	4096	>4096	>4096	>4096	>4096

Tomando los valores de referencia del CLSI (Tabla 7), en este estudio vemos que la CMI para CIP en el caso de *M. abscessus* y *M. mucogenicum* es intermedio, y la CLR resistente en *M. mageritense*.

5.3. Estudio del efecto de antibióticos en la estructura de biopelículas de MNPCR mediante microscopía confocal láser de barrido

5.3.1. Ciprofloxacino

Los resultados obtenidos con el antibiótico ciprofloxacino vienen representados en la Fig.32.

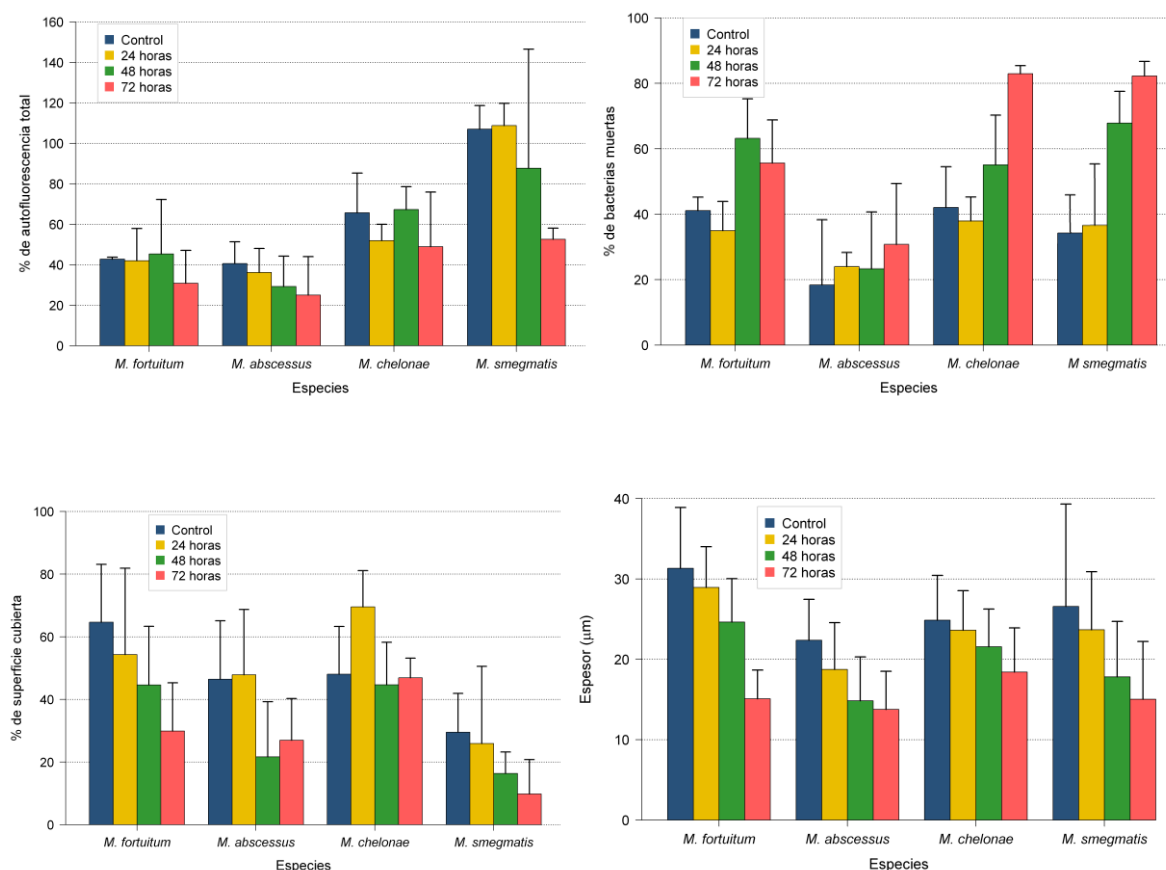


Figura 32. Efecto de ciprofloxacino en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.

a) Porcentaje de autofluorescencia

b) Porcentaje de bacterias muertas

c) Porcentaje de superficie cubierta

d) Espesor

Tiempo: h de incubación con ciprofloxacino (24,48,72h) y control sin antibiótico (96h)

En la Tabla 13 se muestran los valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies estudiadas según el test no paramétrico Mann-Whitney.

Tabla 13. Valores *p* obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a ciprofloxacino según el test Mann-Whitney.

Especie	Comparaciones Tiempo (h)	%de superficie cubierta	%de bacterias muertas	Espesor	Autofluorescencia
<i>M. fortuitum</i>	24-48	0,8273	0,0495*	0,0020*	0,8273
	24-72	0,1266	0,1266	<0,0001*	0,5127
	24-96	0,8273	0,2752	0,0950	0,5127
	48-72	0,2752	0,5127	<0,0001*	0,5127
	48-96	0,1266	0,0495*	<0,0001*	0,5127
	72-96	0,1266	0,2752	<0,0001*	0,5127
<i>M. abscessus</i>	24-48	0,1266	0,5127	0,0013*	0,2752
	24-72	0,1266	0,5127	<0,0001*	0,2752
	24-96	0,8273	0,5127	0,0050*	0,5127
	48-72	0,2752	0,5127	0,3266	0,8273
	48-96	0,2752	0,2752	<0,0001*	0,2752
	72-96	0,2752	0,2752	<0,0001*	0,2752
<i>M. chelonae</i>	24-48	0,0495*	0,0495*	0,0369*	0,1266
	24-72	0,0495*	0,0495*	<0,0001*	0,8273
	24-96	0,1266	0,5127	0,3079	0,2752
	48-72	0,8273	0,0495*	0,0060*	0,2752
	48-96	0,8273	0,5127	0,0061*	0,8273
	72-96	0,8273	0,0495*	<0,0001*	0,5127
<i>M. smegmatis</i>	24-48	0,8273	0,0495*	0,0001*	0,5127
	24-72	0,5127	0,0495*	<0,0001*	0,0495*
	24-96	1,0000	1,0000	0,1037	0,5637
	48-72	0,5127	0,1266	0,0357	0,5127
	48-96	0,5637	0,0833	0,0004*	0,5637
	72-96	0,2482	0,0833	<0,0001*	0,0833

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

La media y desviación estándar para cada especie y para los diferentes parámetros según el tiempo de exposición a ciprofloxacino (24, 48, 72h), y control sin antibiótico (96h) vienen especificados en las Tablas 14-15.

Tabla 14. Valores de espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a ciprofloxacino.

Especie	Espesor (μm)				% de bacterias muertas			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	31,32 \pm 7,58	28,93 \pm 5,09	24,63 \pm 5,40	15,08 \pm 3,59	41,07 \pm 4,13	34,99 \pm 8,89	63,21 \pm 12,05	55,65 \pm 13,18
<i>M. abscessus</i>	22,37 \pm 5,09	18,75 \pm 5,81	14,84 \pm 5,45	13,77 \pm 4,74	18,38 \pm 19,93	24,00 \pm 4,27	23,32 \pm 17,35	30,77 \pm 18,59
<i>M. chelonae</i>	24,86 \pm 5,58	23,62 \pm 4,92	21,56 \pm 4,70	18,41 \pm 5,49	42,04 \pm 12,44	37,96 \pm 7,29	55,08 \pm 15,18	82,93 \pm 2,46
<i>M. smegmatis</i>	26,58 \pm 12,72	23,67 \pm 7,22	17,83 \pm 6,88	15,02 \pm 7,20	33,14 \pm 11,52	36,62 \pm 18,69	67,87 \pm 9,68	82,25 \pm 4,42

Tabla 15. Valores de % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a ciprofloxacino.

Especie	% de superficie cubierta				% de autofluorescencia			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	64,64 \pm 18,49	54,33 \pm 27,56	44,63 \pm 18,68	29,91 \pm 15,40	42,76 \pm 0,94	41,99 \pm 15,90	45,34 \pm 26,90	30,84 \pm 16,25
<i>M. abscessus</i>	46,46 \pm 18,62	47,88 \pm 20,83	21,67 \pm 17,61	26,95 \pm 13,32	40,59 \pm 10,78	36,18 \pm 11,83	29,24 \pm 15,01	24,99 \pm 19,00
<i>M. chelonae</i>	48,06 \pm 15,22	69,55 \pm 11,58	44,66 \pm 13,59	46,89 \pm 6,26	65,71 \pm 19,60	51,90 \pm 8,07	67,30 \pm 11,25	48,94 \pm 27,00
<i>M. smegmatis</i>	26,50 \pm 15,84	25,90 \pm 24,66	16,37 \pm 6,86	9,83 \pm 10,98	101,50 \pm 9,50	108,76 \pm 11,02	87,71 \pm 58,80	52,59 \pm 5,48

5.3.2. Claritromicina

Los resultados obtenidos con el antibiótico claritromicina vienen representados en la Fig. 33.

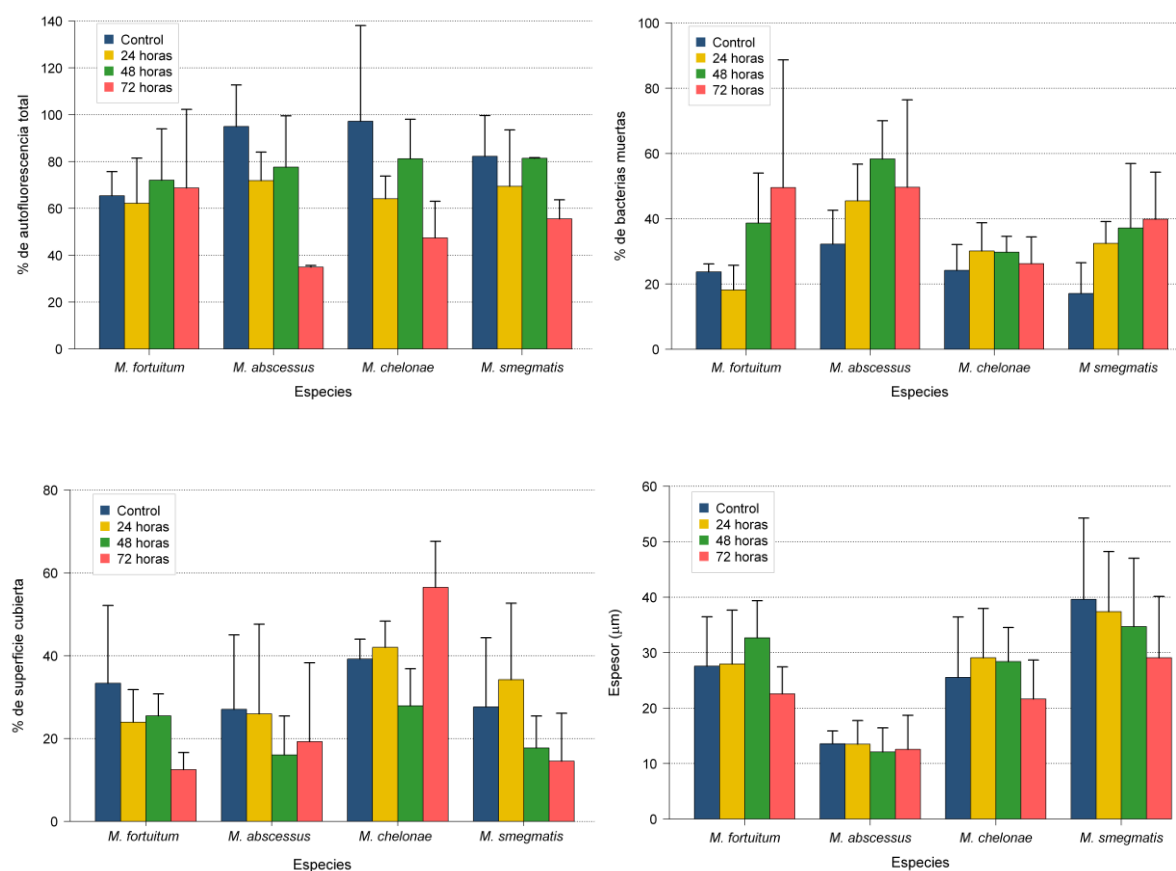


Figura 33. Efecto de claritromicina en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.

a) Porcentaje de autofluorescencia

b) Porcentaje de bacterias muertas

c) Porcentaje de superficie cubierta

d) Espesor

Tiempo: h de incubación con claritromicina (24,48,72h) y control sin antibiótico (96h)

En la Tabla 16 se muestran los valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies estudiadas según el test no paramétrico Mann-Whitney.

Tabla 16. Valores *p* obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a claritromicina según el test Mann-Whitney.

Especie	Comparaciones Tiempo (h)	% de superficie cubierta	% de bacterias muertas	Espesor	Autofluorescencia
<i>M. fortuitum</i>	24-48	0,8273	0,1266	0,0203*	0,8273
	24-72	0,1266	0,1266	0,0154*	0,5127
	24-96	0,5127	0,2752	0,8921	0,8273
	48-72	0,0495*	0,8273	<0,0001*	0,8273
	48-96	0,5127	0,1266	0,0015*	0,8273
	72-96	0,1266	0,2752	0,0031*	0,5127
<i>M. abscessus</i>	24-48	0,5127	0,2752	0,0917	0,8273
	24-72	0,5127	0,8273	0,1184	0,0495*
	24-96	0,8273	0,2752	0,7248	0,2752
	48-72	0,8273	0,8273	0,7861	0,0495*
	48-96	0,5127	0,0495*	0,0436*	0,2752
	72-96	0,5127	0,2752	0,0259*	0,0495*
<i>M. chelonae</i>	24-48	0,0495*	0,8273	0,9561	0,2752
	24-72	0,1266	0,5127	0,0002*	0,1266
	24-96	0,8273	0,5127	0,0902	0,2752
	48-72	0,0495*	0,5127	<0,0001*	0,1266
	48-96	0,1266	0,2752	0,1105	0,5127
	72-96	0,0495*	0,5127	0,1494	0,1266
<i>M. smegmatis</i>	24-48	0,1266	0,8273	0,0725	0,5127
	24-72	0,1266	0,5127	0,0002*	0,2752
	24-96	0,5127	0,0495*	0,6950	0,2752
	48-72	0,8273	0,8273	0,0117	0,0495*
	48-96	0,5127	0,1266	0,0642	0,5127
	72-96	0,2752	0,0495*	0,0001*	0,0495*

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

La media y desviación estándar para cada especie y para los diferentes parámetros según el tiempo de exposición a claritromicina (24, 48, 72h), y control sin antibiótico (96h) vienen especificados en las Tablas 17-18.

Tabla 17. Valores de espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a claritromicina.

Especie	Espesor (μm)				% de bacterias muertas			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	27,55 \pm 8,91	27,95 \pm 9,72	32,67 \pm 6,70	22,58 \pm 4,84	23,70 \pm 2,45	18,17 \pm 7,56	38,68 \pm 15,31	49,54 \pm 39,16
<i>M. abscessus</i>	13,58 \pm 2,31	13,48 \pm 4,25	12,09 \pm 4,33	12,54 \pm 6,16	32,21 \pm 10,40	45,49 \pm 11,26	58,35 \pm 11,69	49,66 \pm 26,79
<i>M. chelonae</i>	25,54 \pm 10,90	29,08 \pm 8,88	28,39 \pm 6,15	21,63 \pm 7,03	24,19 \pm 7,92	30,10 \pm 8,66	29,77 \pm 4,84	26,22 \pm 8,22
<i>M. smegmatis</i>	39,61 \pm 14,66	37,4 \pm 10,83	34,69 \pm 12,32	29,08 \pm 11,05	17,08 \pm 9,44	32,47 \pm 6,67	37,15 \pm 19,78	39,85 \pm 14,42

Tabla 18. Valores de % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a claritromicina.

Especie	% de superficie cubierta				% de autofluorescencia			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	33,37 \pm 18,75	23,94 \pm 7,87	25,48 \pm 5,33	12,51 \pm 4,11	65,40 \pm 10,34	62,21 \pm 19,28	72,10 \pm 21,88	68,73 \pm 33,60
<i>M. abscessus</i>	27,07 \pm 17,93	25,97 \pm 21,65	16,04 \pm 9,41	19,27 \pm 19,02	94,98 \pm 17,75	71,88 \pm 12,19	77,63 \pm 21,89	34,91 \pm 0,76
<i>M. chelonae</i>	39,19 \pm 4,80	42,03 \pm 6,30	27,90 \pm 8,97	56,51 \pm 11,12	97,26 \pm 40,80	64,13 \pm 9,63	81,24 \pm 16,83	47,40 \pm 15,64
<i>M. smegmatis</i>	27,65 \pm 16,66	34,22 \pm 18,45	17,73 \pm 7,71	14,53 \pm 11,60	82,22 \pm 17,42	69,45 \pm 24,10	81,44 \pm 0,22	55,52 \pm 8,19

5.3.3. Amicacina

Los resultados obtenidos con el antibiótico amicacina vienen representados en la Fig. 34.

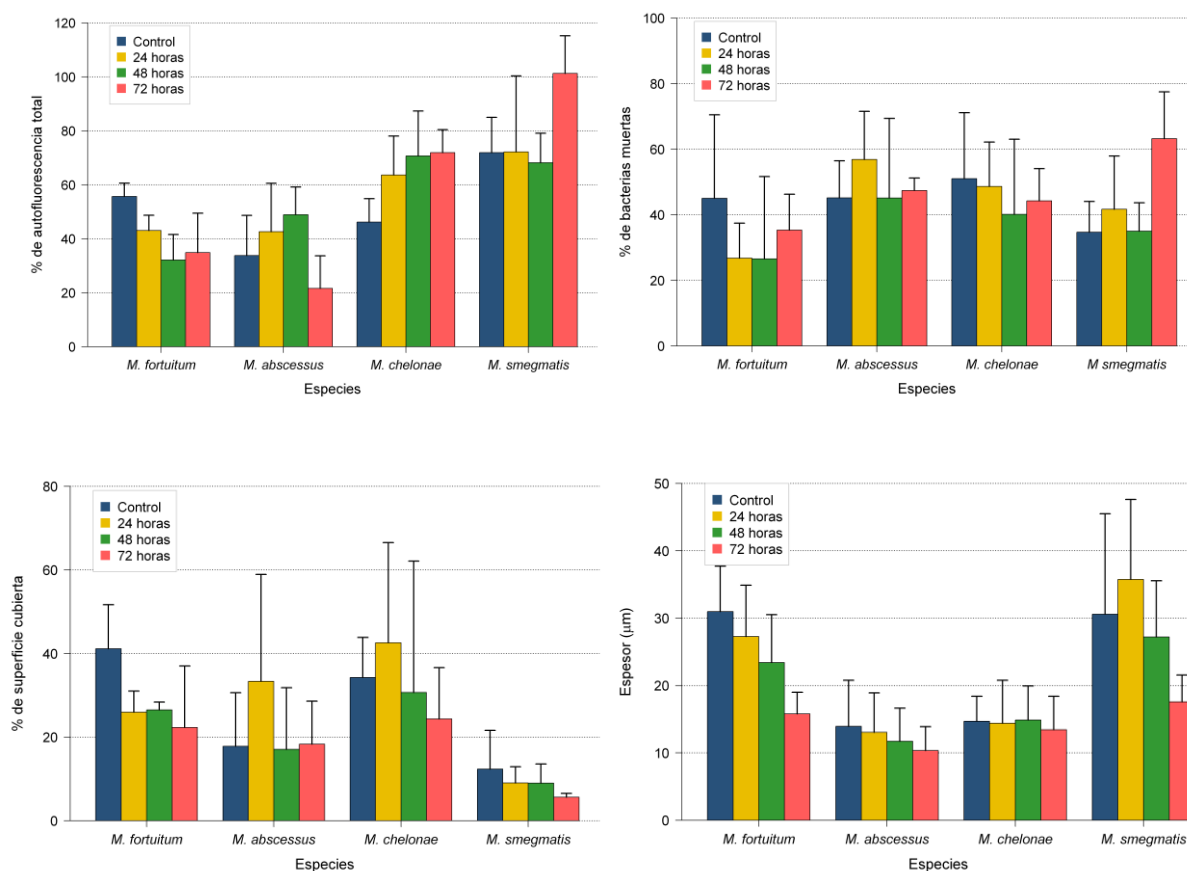


Figura 34. Efecto de amicacina en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.

a) Porcentaje de autofluorescencia

b) Porcentaje de bacterias muertas

c) Porcentaje de superficie cubierta

d) Espesor

Tiempo: h de incubación con amicacina (24,48,72h) y control sin antibiótico (96h)

En la Tabla 19 se muestran los valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies estudiadas según el test no paramétrico Mann-Whitney.

Tabla 19. Valores *p* obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a ampicacina según el test Mann-Whitney.

Especie	Comparaciones Tiempo (h)	% de superficie cubierta	% de bacterias muertas	Espesor	Autofluorescencia
<i>M. fortuitum</i>	24-48	0,5066	0,5127	0,0096*	0,2752
	24-72	0,5066	0,2752	<0,0001*	0,2752
	24-96	0,1212	0,2752	0,0066*	0,0495*
	48-72	0,5127	0,5127	<0,0001*	0,8273
	48-96	0,0495*	0,2752	<0,0001*	0,0495*
	72-96	0,1266	0,8273	<0,0001*	0,0495*
<i>M. abscessus</i>	24-48	0,2752	0,2752	0,2263	0,8273
	24-72	0,5127	0,5127	0,0225*	0,2752
	24-96	0,5127	0,2752	0,6894	0,5127
	48-72	0,8273	0,8273	0,3114	0,0495
	48-96	0,8273	0,8273	0,1158	0,1266
	72-96	0,8273	0,5127	0,0120*	0,2752
<i>M. chelonae</i>	24-48	0,8273	0,5127	0,6706	0,8273
	24-72	0,2752	0,8273	0,4883	0,5127
	24-96	0,5127	0,8273	0,3575	0,1266
	48-72	0,8273	0,5127	0,1474	0,8273
	48-96	0,5127	0,2752	0,5623	0,0495*
	72-96	0,2752	0,8273	0,1819	0,0495*
<i>M. smegmatis</i>	24-48	0,8273	0,5127	0,0003*	0,5127
	24-72	0,2752	0,1266	<0,0001*	0,2752
	24-96	0,5127	0,5127	0,0128*	0,5127
	48-72	0,5127	0,0495*	<0,0001*	0,0495*
	48-96	0,8273	0,8273	0,6948	0,8273
	72-96	0,1266	0,0495*	<0,0001*	0,0495*

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

La media y desviación estándar para cada especie y para los diferentes parámetros según el tiempo de exposición a ampicacina (24, 48, 72h), y control sin antibiótico (96h) vienen especificados en las Tablas 20-21.

Tabla 20. Valores de espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a ampicacina.

Especie	Espesor (μm)				% de bacterias muertas			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	30,96 \pm 6,76	27,27 \pm 7,62	23,41 \pm 7,11	15,80 \pm 3,18	45,04 \pm 25,47	26,78 \pm 10,67	26,56 \pm 25,10	35,33 \pm 10,94
<i>M. abscessus</i>	13,94 \pm 6,83	13,04 \pm 5,87	11,72 \pm 4,93	10,35 \pm 3,54	45,19 \pm 11,26	56,89 \pm 14,66	45,13 \pm 24,28	47,39 \pm 3,83
<i>M. chelonae</i>	14,69 \pm 3,70	14,40 \pm 6,38	14,88 \pm 5,06	13,43 \pm 4,97	51,04 \pm 20,11	48,63 \pm 13,57	40,12 \pm 22,91	44,23 \pm 9,85
<i>M. smegmatis</i>	30,59 \pm 14,89	35,75 \pm 11,88	27,21 \pm 8,34	17,58 \pm 3,98	34,70 \pm 9,36	41,69 \pm 16,22	35,00 \pm 8,63	63,21 \pm 14,26

Tabla 21. Valores de % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a ampicacina.

Especie	% de superficie cubierta				% de autofluorescencia			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	41,16 \pm 10,53	25,97 \pm 5,04	26,50 \pm 1,88	22,32 \pm 14,69	55,70 \pm 4,91	43,05 \pm 5,66	32,16 \pm 9,44	34,87 \pm 14,60
<i>M. abscessus</i>	17,81 \pm 12,79	33,36 \pm 25,55	17,08 \pm 14,74	18,33 \pm 10,28	33,78 \pm 14,91	42,62 \pm 17,96	48,92 \pm 10,30	21,61 \pm 12,07
<i>M. chelonae</i>	34,28 \pm 9,58	42,57 \pm 23,95	30,68 \pm 31,42	24,36 \pm 12,24	46,21 \pm 8,66	63,63 \pm 14,44	70,69 \pm 16,64	71,92 \pm 8,49
<i>M. smegmatis</i>	12,36 \pm 9,24	9,03 \pm 3,87	8,97 \pm 4,59	5,60 \pm 0,93	71,92 \pm 13,10	72,18 \pm 28,19	68,22 \pm 10,91	101,27 \pm 13,96

Respecto al porcentaje de autofluorescencia, observamos una disminución estadísticamente significativa en algunas especies y con algunos antibióticos (Tablas 13, 16 y 19), acentuándose esta disminución sobre todo tras 72h de exposición antibiótica. Así, cabe destacar una reducción en el porcentaje de autofluorescencia de 1,93 veces en *M. smegmatis* tras 72h de exposición a ciprofloxacino al compararlo con 24h ($p=0,0495$) y de 1,48 con claritromicina 72h al compararlo con el control sin antibiótico (96h) ($p=0,0495$), de 2,72 veces en *M. abscessus*

con claritromicina 72h al compararlo con 96h ($p=0,0495$), y de 1,60 en *M. fortuitum* tras 72h de exposición a ampicilina al compararlo con 96h ($p=0,0495$).

De igual forma observamos un aumento estadísticamente significativo en este parámetro en algunas especies y con algunos antibióticos (Tablas 13, 16 y 19), acentuándose este aumento sobre todo tras 72h de exposición antibiótica al compararlos con el control sin antibiótico (96h). Tal es el caso de *M. chelonae* tras 72h de exposición a ampicilina ($p=0,0495$), de 1,56 veces, y de *M. smegmatis* tras 72h de exposición a ampicilina ($p=0,0495$), de 1,4 veces.

5.3.4. Tablas comparativas del efecto de los antibióticos ciprofloxacino, claritromicina y ampicilina en la estructura de biopelículas de MNPCR

En las Tablas 22 y 23 se especifican los valores p obtenidos de los diferentes parámetros al comparar los antibióticos ciprofloxacino, claritromicina y ampicilina entre sí, obteniéndose sólo diferencias estadísticamente significativas en los valores correspondientes al espesor.

Tabla 22. Valores p obtenidos tras comparar el espesor y % de bacterias muertas de MNPCR entre ampicilina (AN), ciprofloxacino (CIP) y claritromicina (CLR) según el test Mann-Whitney.

Especie	Espesor (μm)				% de bacterias muertas			
	Tiempo (h)	AN-CIP	AN-CLR	CIP-CLR	Tiempo (h)	AN-CIP	AN-CLR	CIP-CLR
<i>M. fortuitum</i>	24	0,0959	0,7750	0,4657	24	0,4000	0,4000	0,2000
	48	0,0541	<0,0001*	<0,0001*	48	0,2000	0,4000	0,2000
	72	0,1108	<0,0001*	<0,0001*	72	0,2000	1,0000	0,7000
<i>M. abscessus</i>	24	<0,0001*	0,3575	<0,0001*	24	0,1000	1,0000	0,1000
	48	0,0015*	0,4815	0,0107*	48	0,2000	0,7000	0,1000
	72	0,0005*	0,1148	0,1312	72	0,4000	1,0000	0,7000
<i>M. chelonae</i>	24	<0,0001*	<0,0001*	0,0020*	24	0,4000	0,2000	0,2000
	48	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	48	0,4000	1,0000	0,1000
	72	0,0001*	<0,0001*	0,0288*	72	0,1000	0,1000	0,1000
<i>M. smegmatis</i>	24	<0,0001*	0,3750	<0,0001*	24	0,7000	0,7000	0,7000
	48	<0,0001*	0,0014*	<0,0001*	48	0,1000	1,0000	0,1000
	72	0,0081*	<0,0001*	<0,0001*	72	0,2000	0,4000	0,1000

*Estadísticamente significativo ($p<0,05$)

Tabla 23. Valores *p* obtenidos tras comparar el % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR entre amicacina (AN), ciprofloxacino (CIP) y claritromicina (CLR) según el test Mann-Whitney.

Especie	% de superficie cubierta				% de autofluorescencia			
	Tiempo (h)	AN-CIP	AN-CLR	CIP-CLR	Tiempo (h)	AN-CIP	AN-CLR	CIP-CLR
<i>M. fortuitum</i>	24	0,1840	1,0000	0,2000	24	0,7000	0,4000	0,2000
	48	0,1000	0,7000	0,2000	48	1,0000	0,1000	0,4000
	72	0,4000	0,4000	0,1000	72	0,7000	0,4000	0,4000
<i>M. abscessus</i>	24	1,0000	0,7000	0,4000	24	1,0000	0,2000	0,1000
	48	0,7000	1,0000	0,7000	48	0,2000	0,1000	0,1000
	72	1,0000	1,0000	0,4000	72	1,0000	0,1000	0,7000
<i>M. chelonae</i>	24	0,2000	0,7000	0,1000	24	0,4000	1,0000	0,2000
	48	0,7000	0,7000	0,2000	48	1,0000	0,7000	0,4000
	72	0,1000	0,1000	0,4000	72	0,4000	0,2000	1,0000
<i>M. smegmatis</i>	24	0,7000	0,1000	0,7000	24	0,2000	1,0000	0,1000
	48	0,4000	0,1000	1,0000	48	1,0000	0,1000	0,7000
	72	1,0000	0,7000	0,7000	72	0,1000	0,1000	1,0000

5.4. Estudio de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima de erradicación de biopelículas de MNPCR frente a diferentes agentes antibiopelícula y combinación de antibióticos y agentes antibiopelícula

Los resultados de CMI y CMEBs se especifican en las Tablas 24-25.

Tabla 24. Valores de CMI de agentes antibiopelícula (NAC y Tween 80) en MNPCR.

		<i>M. abscessus</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. smegmatis</i>
CMI	NAC (mg/L)	4096	4096	2048	2048
	Tween 80 (%)	>40	>40	>40	>40

Tabla 25. Valores de CMEB de combinaciones de agentes antibiopelícula (NAC y Tween 80) con ciprofloxacino (CIP), claritromicina (CLR) y ampicilina (AN) en MNPCR.

		<i>M. abscessus</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. smegmatis</i>
CMEB (mg/L)	CIP + Tween 80 0,5%	4096**	256	4096**	128*
	CLR + Tween 80 0,5%	4096	>4096	>4096	>4096
	AN + Tween 80 0,5%	4096	>4096	4096	512*
CMEB (mg/L)	CIP + NAC 512 mg/L	4096**	128	2048**	64*
	CLR + NAC 512 mg/L	4096	>4096	>4096	>4096
	AN + NAC 512 mg/L	4096	1024*	4096	1024*

*Disminución en ≥ 2 diluciones de la CMEB de antibiótico junto NAC/Tween con respecto a la CMEB de antibiótico solo (véase Tabla 12) **Aumento en ≥ 2 diluciones de la CMEB de antibiótico junto NAC/Tween con respecto a la CMEB de antibiótico solo (véase Tabla 12)

NAC y Tween 80 no muestran propiedades antibacterianas cuando se emplean solos frente a las MNPCR en estudio (Tabla 24) alcanzándose consecuentemente concentraciones mínimas inhibitorias muy elevadas, 4096 mg/L de NAC en el caso de *M. abscessus* y *M. fortuitum*, y 2048 mg/L de NAC para *M. chelonae* y *M. smegmatis*. De igual forma, en el caso de Tween 80 se alcanzaron concentraciones de >40% para todas las MNPCR. Sin embargo, NAC y Tween 80, a concentraciones mucho menores (512 mg/L para NAC y 0,5% para Tween 80) y en combinación con antibióticos, sí mostraron propiedades antibacterianas con una reducción en la CMEB de al menos 2 diluciones en el caso de *M. fortuitum* y *M. smegmatis* (Tabla 25).

Todas las especies presentaron una alta resistencia a CLR, superior o igual a 4096 mg/L.

5.5. Estudio del efecto de la combinación de antibióticos y agentes antibiopelícula en la estructura de biopelículas de MNPCR mediante microscopía confocal láser de barrido

5.5.1. Ciprofloxacino-Tween

Los resultados obtenidos con ciprofloxacino-Tween vienen representados en la Fig. 35.

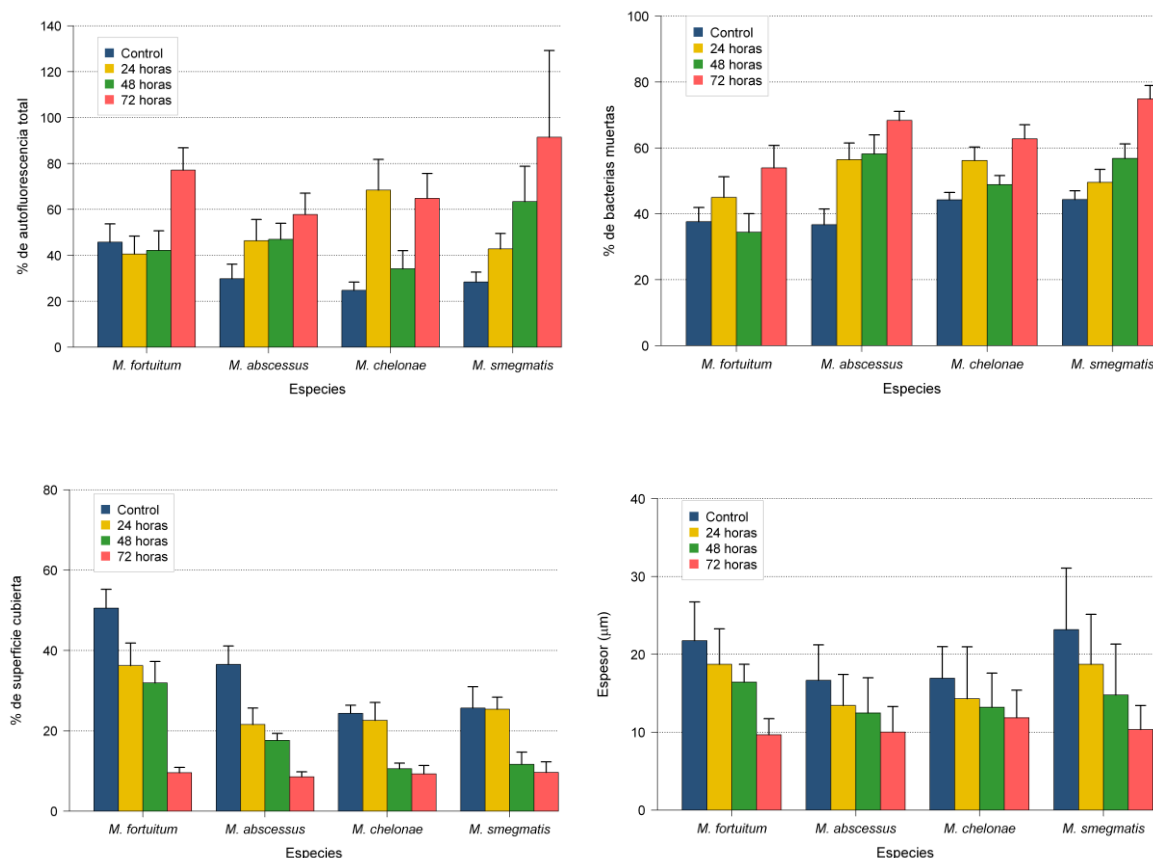


Figura 35. Efecto de ciprofloxacino-Tween en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.

a) Porcentaje de autofluorescencia

b) Porcentaje de bacterias muertas

c) Porcentaje de superficie cubierta

d) Espesor

Tiempo: h de incubación con ciprofloxacino-Tween (24,48,72h) y control sin antibiótico (96h)

En la Tabla 26 se muestran los valores *p* obtenidos para cada uno de los parámetros y especies estudiadas según el test no paramétrico Mann-Whitney.

Tabla 26. Valores *p* obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a ciprofloxacino-Tween según el test Mann-Whitney.

Especie	Comparaciones Tiempo (h)	% de superficie cubierta	% de bacterias muertas	Espesor	Autofluorescencia
<i>M. fortuitum</i>	24-48	0,4347	0,3697	0,0086*	0,9308
	24-72	0,0002*	0,2347	<0,0001*	0,0163*
	24-96	0,0600	0,5825	0,0067*	0,7503
	48-72	0,0016*	0,0028*	<0,0001*	0,0301*
	48-96	0,0302*	0,1737	<0,0001*	0,7071
	72-96	<0,0001*	0,0220*	<0,0001*	0,0119*
<i>M. abscessus</i>	24-48	0,6224	0,7948	0,2077	0,7500
	24-72	0,0013*	0,1118	0,0003*	0,3107
	24-96	0,0099*	0,0118*	0,0019*	0,3692
	48-72	0,0002*	0,3112	0,0074*	0,4016
	48-96	0,0020*	0,0071*	0,0002*	0,0776
	72-96	<0,0001*	0,0006*	<0,0001*	0,0684
<i>M. chelonae</i>	24-48	0,0254*	0,0993	0,3616	0,0400*
	24-72	0,0153*	0,1403	0,1447	0,9310
	24-96	0,5065	0,0099*	0,0007*	0,0072*
	48-72	0,2593	0,0401*	0,2348	0,0400*
	48-96	0,0002*	0,1244	<0,0001*	0,5055
	72-96	0,0005*	0,0034*	<0,0001*	0,0043*
<i>M. smegmatis</i>	24-48	0,0061*	0,3704	0,0017*	0,5440
	24-72	0,0016*	0,0011*	<0,0001*	0,7072
	24-96	0,3702	0,4701	0,0037*	0,0994
	48-72	0,2913	0,0045*	0,0001*	1,0000
	48-96	0,0016*	0,0284*	<0,0001*	0,0262*
	72-96	0,0042*	<0,0001*	<0,0001*	0,2600

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

La media y desviación estándar para cada especie y para los diferentes parámetros según el tiempo de exposición a ciprofloxacino-Tween (24, 48, 72h), y control sin antibiótico (96h) vienen especificados en las Tablas 27-28.

Tabla 27. Valores de espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a ciprofloxacino-Tween.

Especie	Espesor (μm)				% de bacterias muertas			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	21,75 \pm 4,98	18,71 \pm 4,56	16,44 \pm 2,28	9,67 \pm 2,06	37,63 \pm 14,84	45,00 \pm 21,62	34,44 \pm 19,44	53,95 \pm 23,57
<i>M. abscessus</i>	16,67 \pm 4,54	13,44 \pm 3,98	12,48 \pm 4,51	10,03 \pm 3,28	36,73 \pm 16,34	56,45 \pm 17,40	58,19 \pm 20,04	68,33 \pm 9,63
<i>M. chelonae</i>	16,94 \pm 4,05	14,30 \pm 6,67	13,20 \pm 4,38	11,86 \pm 3,53	44,26 \pm 7,66	56,19 \pm 14,03	48,86 \pm 9,56	62,77 \pm 14,80
<i>M. smegmatis</i>	23,18 \pm 7,89	18,71 \pm 6,43	14,79 \pm 6,52	10,34 \pm 3,11	44,36 \pm 9,06	49,56 \pm 13,66	56,83 \pm 15,18	74,89 \pm 14,08

Tabla 28. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a ciprofloxacino-Tween.

Especie	% de superficie cubierta				% de autofluorescencia			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	50,53 \pm 16,27	36,24 \pm 19,46	31,92 \pm 18,55	9,58 \pm 4,56	45,76 \pm 27,51	40,59 \pm 27,05	42,16 \pm 29,53	77,12 \pm 33,77
<i>M. abscessus</i>	36,55 \pm 15,79	21,55 \pm 14,29	17,63 \pm 5,91	8,53 \pm 4,42	29,78 \pm 22,09	46,40 \pm 31,90	46,96 \pm 24,11	57,81 \pm 32,01
<i>M. chelonae</i>	24,37 \pm 6,91	22,58 \pm 15,57	10,55 \pm 4,86	9,28 \pm 7,17	24,76 \pm 12,29	68,44 \pm 46,30	34,13 \pm 27,42	64,83 \pm 37,49
<i>M. smegmatis</i>	25,68 \pm 18,34	25,37 \pm 10,39	11,65 \pm 10,52	9,63 \pm 9,14	28,41 \pm 14,80	42,79 \pm 23,28	63,41 \pm 53,27	91,50 \pm 130,65

5.5.2. Ciprofloxacino-NAC

Los resultados obtenidos con ciprofloxacino-NAC vienen representados en la Fig. 36.

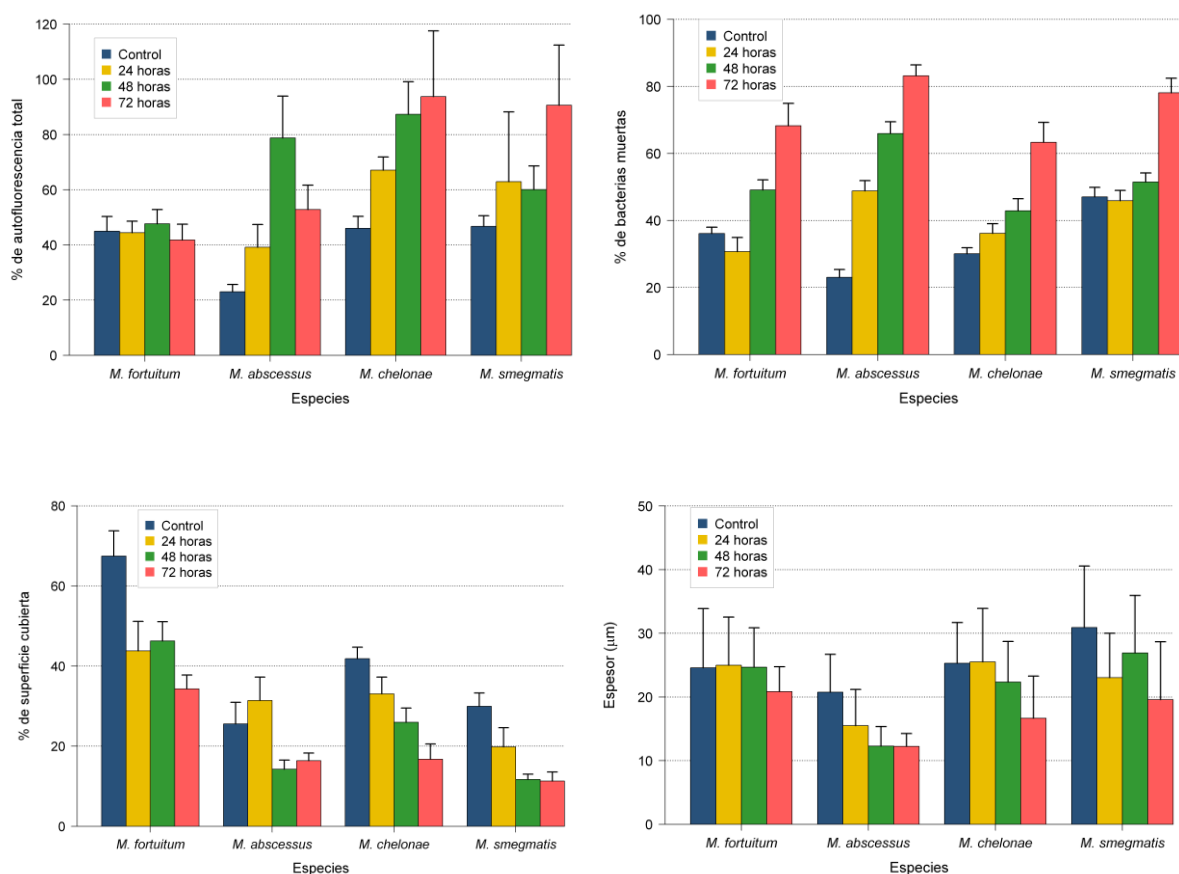


Figura 36. Efecto de ciprofloxacino-NAC en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.

a) Porcentaje de autofluorescencia

b) Porcentaje de bacterias muertas

c) Porcentaje de superficie cubierta

d) Espesor

Tiempo: horas de incubación con ciprofloxacino-NAC (24,48,72h) y control sin antibiótico (96h)

En la Tabla 29 se muestran los valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies estudiadas según el test no paramétrico Mann-Whitney.

Tabla 29. Valores *p* obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a ciprofloxacino-NAC según el test Mann-Whitney.

Especie	Comparaciones Tiempo (h)	% de superficie cubierta	% de bacterias muertas	Espesor	Autofluorescencia
<i>M. fortuitum</i>	24-48	0,5066	0,0020*	0,9007	0,7553
	24-72	0,7125	0,0007*	0,0056*	0,9323
	24-96	0,0141*	0,6649	0,4787	0,8852
	48-72	0,0530	0,0284*	0,0009*	0,3777
	48-96	0,0165*	0,0018*	0,3746	1,0000
	72-96	0,0002*	0,0007*	0,1273	0,6649
<i>M. abscessus</i>	24-48	0,0072*	0,0029*	0,0052*	0,0303*
	24-72	0,0141*	0,0001*	0,0047*	0,4023
	24-96	0,6235	<0,0001*	<0,0001*	0,3707
	48-72	0,3407	0,0024*	0,7786	0,3707
	48-96	0,0284*	<0,0001*	<0,0001*	0,0014*
	72-96	0,0350*	<0,0001*	<0,0001*	0,0086*
<i>M. chelonae</i>	24-48	0,2601	0,1565	0,0557	0,2365
	24-72	0,0072*	0,0007*	<0,0001*	0,9310
	24-96	0,0687	0,2136	0,8230	0,0061*
	48-72	0,0884	0,0402*	<0,0001*	0,3706
	48-96	0,0060*	0,0119*	0,0498*	0,0006*
	72-96	0,0013*	<0,0001*	<0,0001*	0,0302*
<i>M. smegmatis</i>	24-48	0,3107	0,0598	0,0228*	0,2359
	24-72	0,1936	0,0002*	0,0026*	0,0997
	24-96	0,0165*	0,6017	<0,0001*	0,6233
	48-72	0,7948	0,0002*	<0,0001*	0,2851
	48-96	0,0002*	0,1782	0,0246*	0,4700
	72-96	0,0007*	0,0001*	<0,0001*	0,0782

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

La media y desviación estándar para cada especie y para los diferentes parámetros según el tiempo de exposición a ciprofloxacino-NAC (24, 48, 72h), y control sin antibiótico (96h) vienen especificados en las Tablas 30-31.

Tabla 30. Valores de espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a ciprofloxacino-NAC.

Especie	Espesor (μm)				% de bacterias muertas			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	24,57 \pm 9,30	24,99 \pm 7,56	24,67 \pm 6,18	20,85 \pm 3,89	36,13 \pm 6,42	30,69 \pm 14,73	49,11 \pm 10,42	68,24 \pm 23,17
<i>M. abscessus</i>	20,75 \pm 5,95	15,50 \pm 5,67	12,28 \pm 3,08	12,23 \pm 2,02	23,04 \pm 8,01	48,81 \pm 10,65	65,92 \pm 12,19	83,15 \pm 11,34
<i>M. chelonae</i>	25,30 \pm 6,41	25,51 \pm 8,39	22,35 \pm 6,37	16,67 \pm 6,60	30,08 \pm 6,19	36,16 \pm 9,96	42,89 \pm 12,42	63,32 \pm 20,64
<i>M. smegmatis</i>	30,92 \pm 9,64	23,04 \pm 6,95	26,92 \pm 9,04	19,58 \pm 9,09	47,02 \pm 9,93	45,89 \pm 10,73	51,47 \pm 9,36	78,07 \pm 15,18

Tabla 31. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a ciprofloxacino-NAC.

Especie	% de superficie cubierta				% de autofluorescencia			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	67,46 \pm 21,80	43,77 \pm 25,52	46,28 \pm 16,59	34,32 \pm 11,82	44,99 \pm 18,36	44,43 \pm 14,40	47,67 \pm 17,78	41,79 \pm 19,82
<i>M. abscessus</i>	25,55 \pm 18,64	31,40 \pm 20,21	14,25 \pm 7,85	16,37 \pm 6,66	23,03 \pm 9,04	39,16 \pm 28,48	78,79 \pm 52,52	52,84 \pm 30,64
<i>M. chelonae</i>	41,83 \pm 9,87	33,06 \pm 14,43	25,97 \pm 12,23	16,74 \pm 13,16	46,00 \pm 15,14	67,07 \pm 16,56	87,33 \pm 41,00	93,75 \pm 82,64
<i>M. smegmatis</i>	29,94 \pm 11,57	19,83 \pm 16,58	11,71 \pm 4,46	11,31 \pm 7,80	46,75 \pm 13,34	62,93 \pm 87,67	60,06 \pm 29,68	90,62 \pm 75,54

5.5.3. Claritromicina-Tween

Los resultados obtenidos con claritromicina-Tween vienen representados en la Fig. 37.

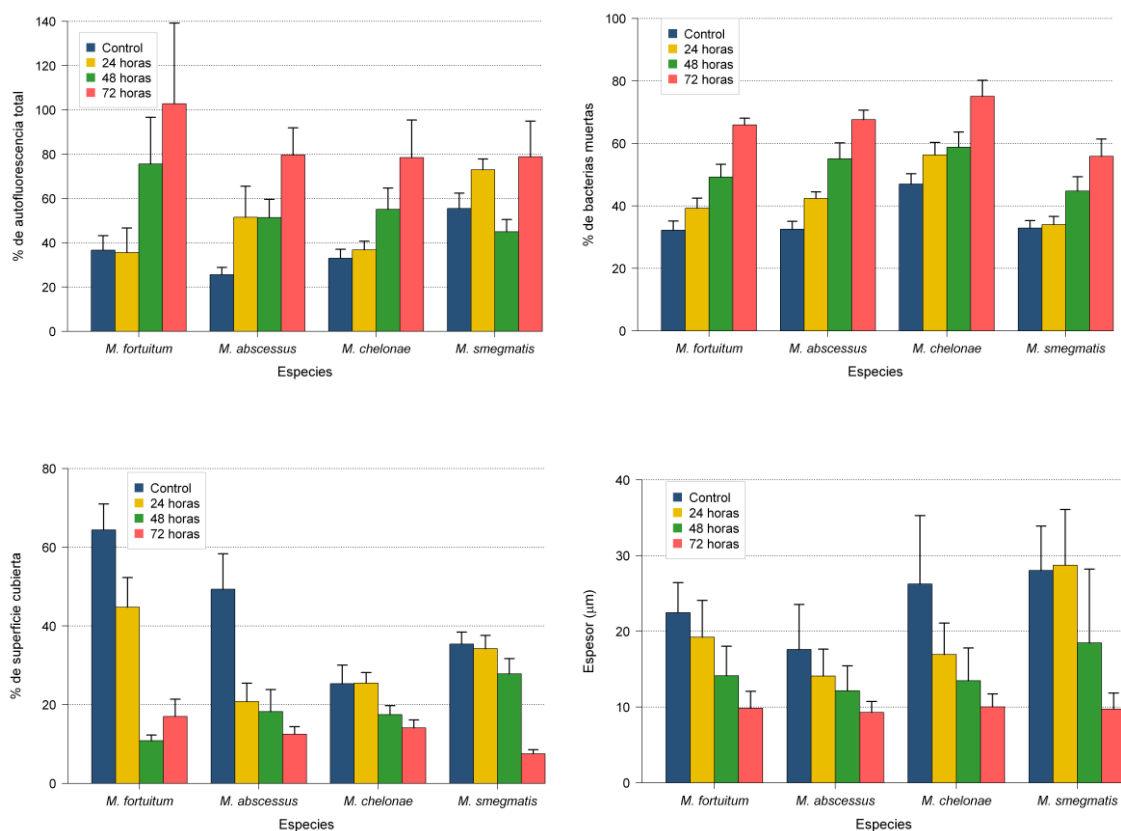


Figura 37. Efecto de claritromicina-Tween en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.

a) Porcentaje de autofluorescencia

b) Porcentaje de bacterias muertas

c) Porcentaje de superficie cubierta

d) Espesor

Tiempo: horas de incubación con claritromicina-Tween (24,48,72h) y control sin antibiótico (96h)

En la Tabla 32 se muestran los valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies estudiadas según el test no paramétrico Mann-Whitney.

Tabla 32. Valores *p* obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a claritromicina-Tween según el test Mann-Whitney.

Especie	Comparaciones Tiempo (h)	% de superficie cubierta	% de bacterias muertas	Espesor	Autofluorescencia
<i>M. fortuitum</i>	24-48	0,0005*	0,1254	<0,0001*	0,2595
	24-72	0,0061*	<0,0001*	<0,0001*	0,0529
	24-96	0,0604	0,0685	0,0001*	0,3404
	48-72	0,5831	0,0029*	<0,0001*	0,8398
	48-96	<0,0001*	0,0029*	<0,0001*	0,3705
	72-96	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,4428
<i>M. abscessus</i>	24-48	0,3474	0,0165*	0,0006*	0,5512
	24-72	0,1746	0,0001*	<0,0001*	0,0462*
	24-96	0,0209*	0,0681	0,0019*	0,1123
	48-72	0,8852	0,0165*	<0,0001*	0,0688
	48-96	0,0009*	0,0006*	<0,0001*	0,0120*
	72-96	0,0009*	<0,0001*	<0,0001*	0,0001*
<i>M. chelonae</i>	24-48	0,0463*	0,8428	<0,0001*	0,1937
	24-72	0,0086*	0,0179*	<0,0001*	0,0225*
	24-96	0,6649	0,1120	<0,0001*	0,5442
	48-72	0,2657	0,0449*	<0,0001*	0,4776
	48-96	0,2657	0,0604	<0,0001*	0,1005
	72-96	0,0519	0,0006*	<0,0001*	0,0121*
<i>M. smegmatis</i>	24-48	0,1978	0,0603	<0,0001*	0,0018*
	24-72	<0,0001*	0,0138*	<0,0001*	0,7125
	24-96	1,0000	0,7505	0,4235	0,0519
	48-72	0,0003*	0,1249	<0,0001*	0,3186
	48-96	0,1432	0,0349*	<0,0001*	0,1978
	72-96	<0,0001*	0,0100*	<0,0001*	0,6297

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

La media y desviación estándar para cada especie y para los diferentes parámetros según el tiempo de exposición a claritromicina-Tween (24, 48, 72h), y control sin antibiótico (96h) vienen especificados en las Tablas 33-34.

Tabla 33. Espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a claritromicina-Tween.

Especie	Espesor (μm)				% de bacterias muertas			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	22,47 \pm 3,95	19,22 \pm 4,87	14,12 \pm 3,91	9,85 \pm 2,23	32,23 \pm 10,05	39,27 \pm 11,15	49,24 \pm 14,07	65,92 \pm 7,41
<i>M. abscessus</i>	17,61 \pm 5,92	14,09 \pm 3,56	12,15 \pm 3,29	9,29 \pm 1,44	32,55 \pm 8,73	42,40 \pm 7,19	55,10 \pm 17,61	67,60 \pm 10,58
<i>M. chelonae</i>	26,25 \pm 9,02	16,93 \pm 4,15	13,47 \pm 4,34	10,03 \pm 1,70	47,00 \pm 11,48	56,31 \pm 13,87	58,79 \pm 16,88	75,05 \pm 17,86
<i>M. smegmatis</i>	28,04 \pm 5,85	28,72 \pm 7,36	18,46 \pm 9,74	9,74 \pm 2,11	32,93 \pm 8,24	33,99 \pm 9,03	44,77 \pm 15,83	55,86 \pm 19,12

Tabla 34. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a claritromicina-Tween.

Especie	% de superficie cubierta				% de autofluorescencia			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	64,43 \pm 22,72	44,78 \pm 26,04	10,84 \pm 4,95	17,01 \pm 15,23	36,66 \pm 22,61	35,55 \pm 38,44	75,56 \pm 73,09	102,80 \pm 126,31
<i>M. abscessus</i>	49,35 \pm 31,09	20,79 \pm 16,08	18,26 \pm 19,37	12,51 \pm 6,56	25,61 \pm 11,25	51,53 \pm 48,44	51,39 \pm 28,41	79,68 \pm 42,37
<i>M. chelonae</i>	25,35 \pm 16,24	25,48 \pm 9,25	17,48 \pm 7,84	14,10 \pm 7,02	33,02 \pm 13,98	36,79 \pm 13,62	55,11 \pm 33,13	78,47 \pm 58,66
<i>M. smegmatis</i>	35,41 \pm 10,46	34,23 \pm 11,60	27,82 \pm 13,45	7,52 \pm 3,59	55,47 \pm 24,11	72,97 \pm 16,91	44,99 \pm 19,08	78,84 \pm 55,65

5.5.4. Claritromicina-NAC

Los resultados obtenidos con claritromicina-NAC vienen representados en la Fig. 38.

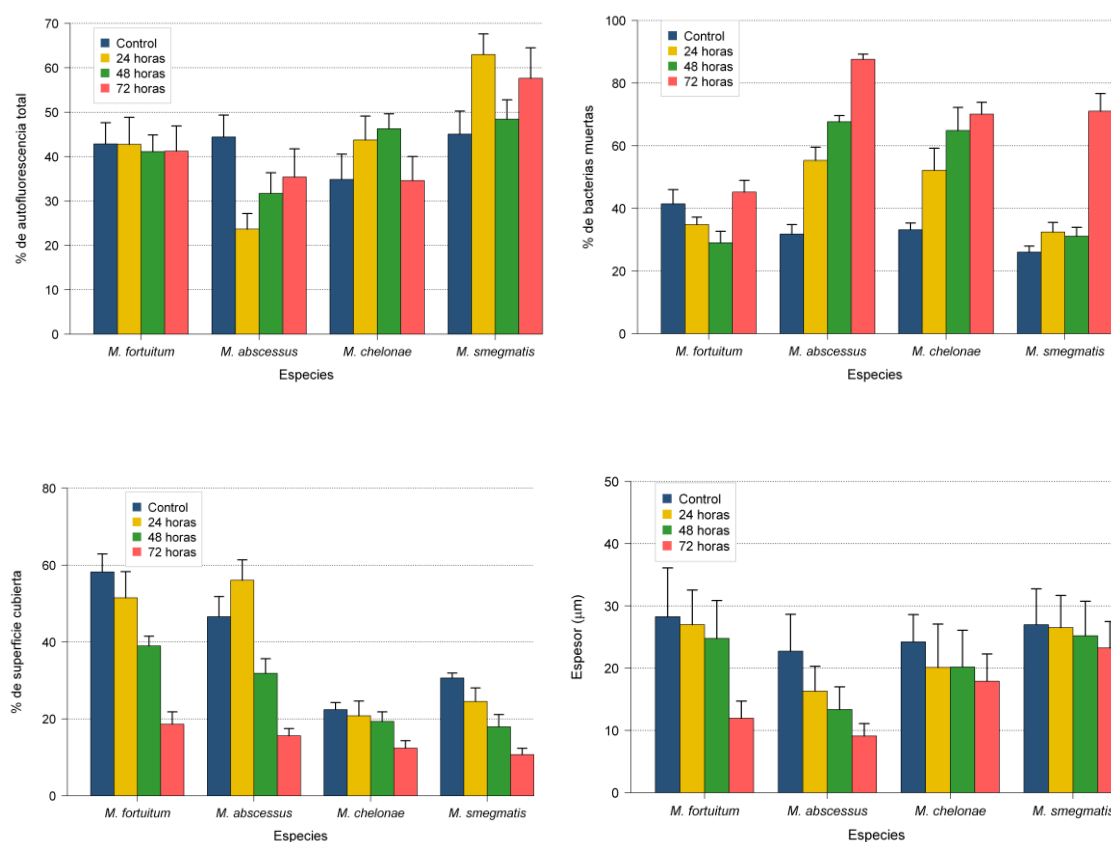


Figura 38. Efecto de claritromicina-NAC en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.

a) Porcentaje de autofluorescencia

b) Porcentaje de bacterias muertas

c) Porcentaje de superficie cubierta

d) Espesor

Tiempo: horas de incubación con claritromicina-NAC (24,48,72h) y control sin antibiótico (96h)

En la Tabla 35 se muestran los valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies estudiadas según el test no paramétrico Mann-Whitney.

Tabla 35. Valores *p* obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a claritromicina-NAC según el test Mann-Whitney.

Especie	Comparaciones Tiempo (h)	% de superficie cubierta	% de bacterias muertas	Espesor	Autofluorescencia
<i>M. fortuitum</i>	24-48	0,1277	0,1782	0,1644	0,9323
	24-72	0,0003*	0,0519	<0,0001*	0,9323
	24-96	0,3186	0,2415	0,5257	0,8874
	48-72	0,0001*	0,0121*	<0,0001*	0,9774
	48-96	0,0014*	0,0684	0,0974	1,0000
	72-96	<0,0001*	0,7125	<0,0001*	0,7553
<i>M. abscessus</i>	24-48	0,0043*	0,0145*	0,0005*	0,0887
	24-72	0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,0684
	24-96	0,1748	0,0007*	<0,0001*	0,0029*
	48-72	0,0045*	<0,0001*	<0,0001*	0,5137
	48-96	0,0887	<0,0001*	<0,0001*	0,0449*
	72-96	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,0780
<i>M. chelonae</i>	24-48	1,0000	0,1123	0,6491	0,5899
	24-72	0,1135	0,0530	0,3634	0,1782
	24-96	0,4428	0,0885	0,0003*	0,2415
	48-72	0,0387*	0,8874	0,0483*	0,0449*
	48-96	0,2913	0,0029*	0,0008*	0,0684
	72-96	0,0018*	<0,0001*	<0,0001*	1,0000
<i>M. smegmatis</i>	24-48	0,2415	0,9770	0,2100	0,0387*
	24-72	0,0083*	0,0002*	0,0010*	0,5137
	24-96	0,2415	0,0883	0,7136	0,0449*
	48-72	0,0449*	0,0002*	0,0739	0,4776
	48-96	0,0018*	0,2415	0,1314	0,6707
	72-96	<0,0001*	0,0001*	0,0010*	0,1978

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

La media y desviación estándar para cada especie y para los diferentes parámetros según el tiempo de exposición a claritromicina-NAC (24, 48, 72h), y control sin antibiótico (96h) vienen especificados en las Tablas 36-37.

Tabla 36. Espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a claritromicina-NAC.

Especie	Espesor (μm)				% de bacterias muertas			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	28,26 \pm 7,82	26,99 \pm 5,57	24,78 \pm 6,09	11,95 \pm 2,76	41,46 \pm 15,60	34,84 \pm 8,24	29,00 \pm 12,76	45,23 \pm 13,01
<i>M. abscessus</i>	22,72 \pm 5,92	16,30 \pm 4,01	13,36 \pm 3,64	9,10 \pm 1,99	31,81 \pm 10,47	55,30 \pm 14,65	67,65 \pm 6,86	87,59 \pm 5,75
<i>M. chelonae</i>	24,23 \pm 4,37	20,11 \pm 6,96	20,18 \pm 5,89	17,90 \pm 4,37	33,19 \pm 7,50	52,15 \pm 24,48	64,88 \pm 25,42	70,08 \pm 13,14
<i>M. smegmatis</i>	26,97 \pm 5,75	26,50 \pm 5,17	25,20 \pm 5,54	23,25 \pm 4,24	26,03 \pm 6,74	32,43 \pm 10,63	31,14 \pm 9,75	71,05 \pm 19,40

Tabla 37. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a claritromicina-NAC.

Especie	% de superficie cubierta				% de autofluorescencia			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	58,22 \pm 16,28	51,49 \pm 23,63	38,98 \pm 8,77	18,61 \pm 11,16	42,85 \pm 16,56	42,75 \pm 21,07	41,13 \pm 13,02	41,21 \pm 19,72
<i>M. abscessus</i>	46,61 \pm 18,10	56,06 \pm 18,39	31,84 \pm 13,18	15,62 \pm 6,45	44,43 \pm 17,01	23,65 \pm 12,21	31,72 \pm 16,06	35,38 \pm 22,02
<i>M. chelonae</i>	22,41 \pm 6,30	20,82 \pm 13,24	19,32 \pm 8,72	12,39 \pm 6,69	34,86 \pm 19,71	43,76 \pm 18,62	46,27 \pm 11,63	34,60 \pm 18,65
<i>M. smegmatis</i>	30,65 \pm 4,42	24,55 \pm 12,06	17,94 \pm 11,06	10,71 \pm 5,64	45,06 \pm 17,93	62,98 \pm 16,09	48,42 \pm 15,10	57,64 \pm 23,79

5.5.5. Amicacina-Tween

Los resultados obtenidos con amicacina-Tween vienen representados en la Fig. 39.

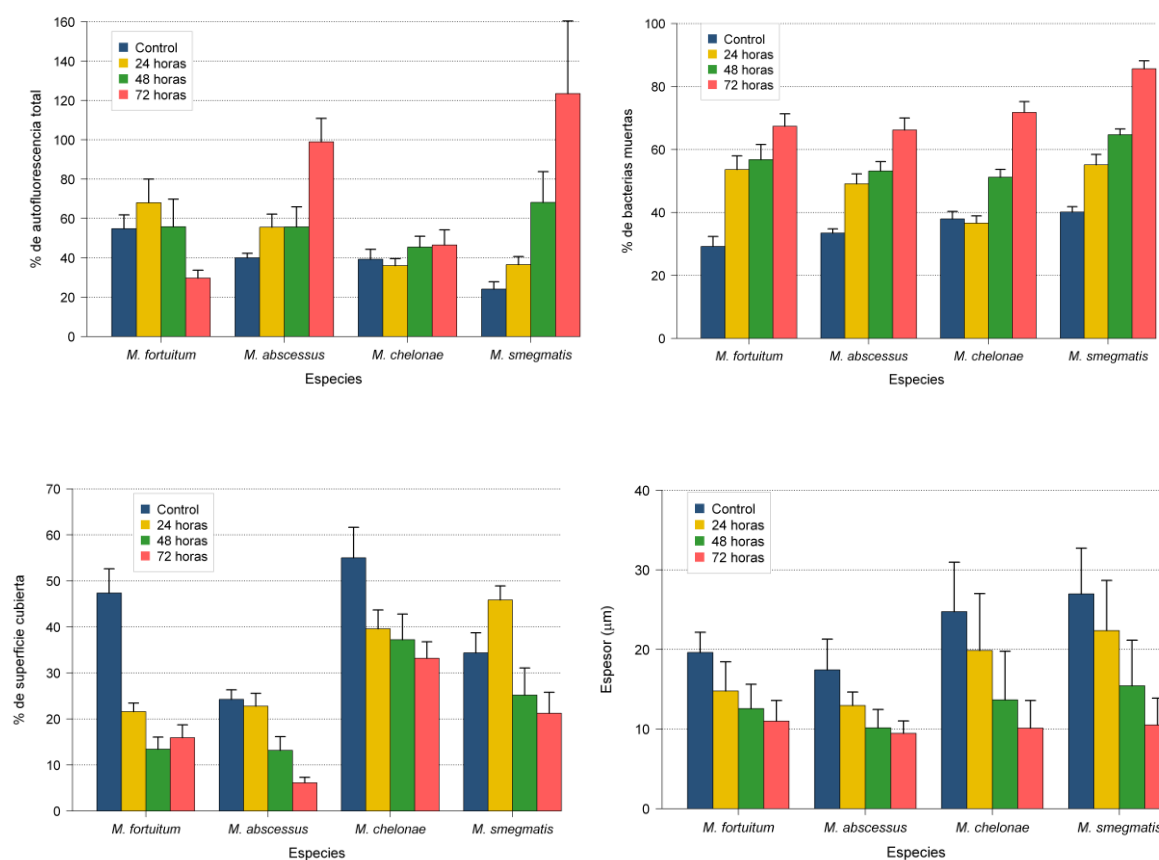


Figura 39. Efecto de amicacina-Tween en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.

a) Porcentaje de autofluorescencia

b) Porcentaje de bacterias muertas

c) Porcentaje de superficie cubierta

d) Espesor

Tiempo: horas de incubación con amicacina-Tween (24,48,72h) y control sin antibiótico (96h)

En la Tabla 38 se muestran los valores p obtenidos para cada uno de los parámetros y especies estudiadas según el test no paramétrico Mann-Whitney.

Tabla 38. Valores *p* obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a ampicina-Tween según el test Mann-Whitney.

Especie	Comparaciones Tiempo (h)	% de superficie cubierta	% de bacterias muertas	Espesor	Autofluorescencia
<i>M. fortuitum</i>	24-48	0,0141*	0,8398	0,0057*	0,2141
	24-72	0,0528	0,0192*	<0,0001*	0,0051*
	24-96	<0,0001*	0,0004*	<0,0001*	0,5825
	48-72	0,5066	0,0996	0,0134*	0,2601
	48-96	0,0001*	0,0005*	<0,0001*	0,6232
	72-96	0,0002*	<0,0001*	<0,0001*	0,0050*
<i>M. abscessus</i>	24-48	0,0257*	0,4697	<0,0001*	0,7064
	24-72	0,0002*	0,0050*	<0,0001*	0,0060*
	24-96	0,3073	0,0003*	<0,0001*	0,1087
	48-72	0,0876	0,0401*	0,1560	0,0041*
	48-96	0,0579	<0,0001*	<0,0001*	0,3657
	72-96	<0,0001*	0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
<i>M. chelonae</i>	24-48	0,4776	0,0009*	<0,0001*	0,2415
	24-72	0,2415	0,0001*	<0,0001*	0,2913
	24-96	0,0997	0,5831	0,0033*	0,9770
	48-72	0,5899	0,0007*	0,0020*	0,9774
	48-96	0,0884	0,0011*	<0,0001*	0,4703
	72-96	0,0303*	<0,0001*	<0,0001*	0,5065
<i>M. smegmatis</i>	24-48	0,0045*	0,0163*	<0,0001*	0,1135
	24-72	0,0002*	0,0001*	<0,0001*	0,1135
	24-96	0,0165*	0,0006*	0,0004*	0,0165*
	48-72	0,6707	0,0001*	<0,0001*	0,5512
	48-96	0,1122	<0,0001*	<0,0001*	0,0051*
	72-96	0,2143	<0,0001*	<0,0001*	0,0086*

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

La media y desviación estándar para cada especie y para los diferentes parámetros según el tiempo de exposición a ampicina-Tween (24, 48, 72h), y control sin antibiótico (96h) vienen especificados en las Tablas 39-40.

Tabla 39. Espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a amicacina-Tween.

Especie	Espesor (μm)				% de bacterias muertas			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	19,62 \pm 2,54	14,78 \pm 3,67	12,57 \pm 3,06	11,00 \pm 2,59	29,20 \pm 11,00	53,62 \pm 15,15	56,79 \pm 16,61	67,39 \pm 13,70
<i>M. abscessus</i>	17,43 \pm 3,86	12,97 \pm 1,68	10,15 \pm 2,31	9,46 \pm 1,55	33,47 \pm 4,51	49,08 \pm 10,99	53,18 \pm 10,26	66,22 \pm 13,09
<i>M. chelonae</i>	24,74 \pm 6,22	19,87 \pm 7,14	13,66 \pm 6,12	10,11 \pm 3,48	37,96 \pm 8,16	36,64 \pm 7,85	51,21 \pm 8,49	71,78 \pm 11,87
<i>M. smegmatis</i>	26,97 \pm 5,75	22,38 \pm 6,30	15,44 \pm 5,73	10,52 \pm 3,36	40,12 \pm 5,98	55,12 \pm 11,41	64,69 \pm 6,33	85,66 \pm 8,65

Tabla 40. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a amicacina-Tween.

Especie	% de superficie cubierta				% de autofluorescencia			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	47,36 \pm 18,18	21,59 \pm 6,51	13,45 \pm 9,02	15,92 \pm 9,71	54,81 \pm 24,48	68,00 \pm 41,60	55,79 \pm 48,60	29,70 \pm 13,86
<i>M. abscessus</i>	24,26 \pm 7,14	22,78 \pm 9,66	13,19 \pm 10,23	6,15 \pm 4,08	40,05 \pm 7,75	55,59 \pm 22,86	55,73 \pm 35,39	98,98 \pm 41,31
<i>M. chelonae</i>	55,03 \pm 22,91	39,59 \pm 14,18	37,21 \pm 19,32	33,17 \pm 12,45	39,28 \pm 17,58	36,05 \pm 12,35	45,50 \pm 19,01	46,55 \pm 26,68
<i>M. smegmatis</i>	34,37 \pm 15,08	45,87 \pm 10,53	25,19 \pm 20,40	21,24 \pm 15,74	24,13 \pm 12,65	36,55 \pm 14,26	68,22 \pm 54,07	123,53 \pm 127,59

5.5.6. Amicacina-NAC

Los resultados obtenidos con amicacina-NAC vienen representados en la Fig. 40.

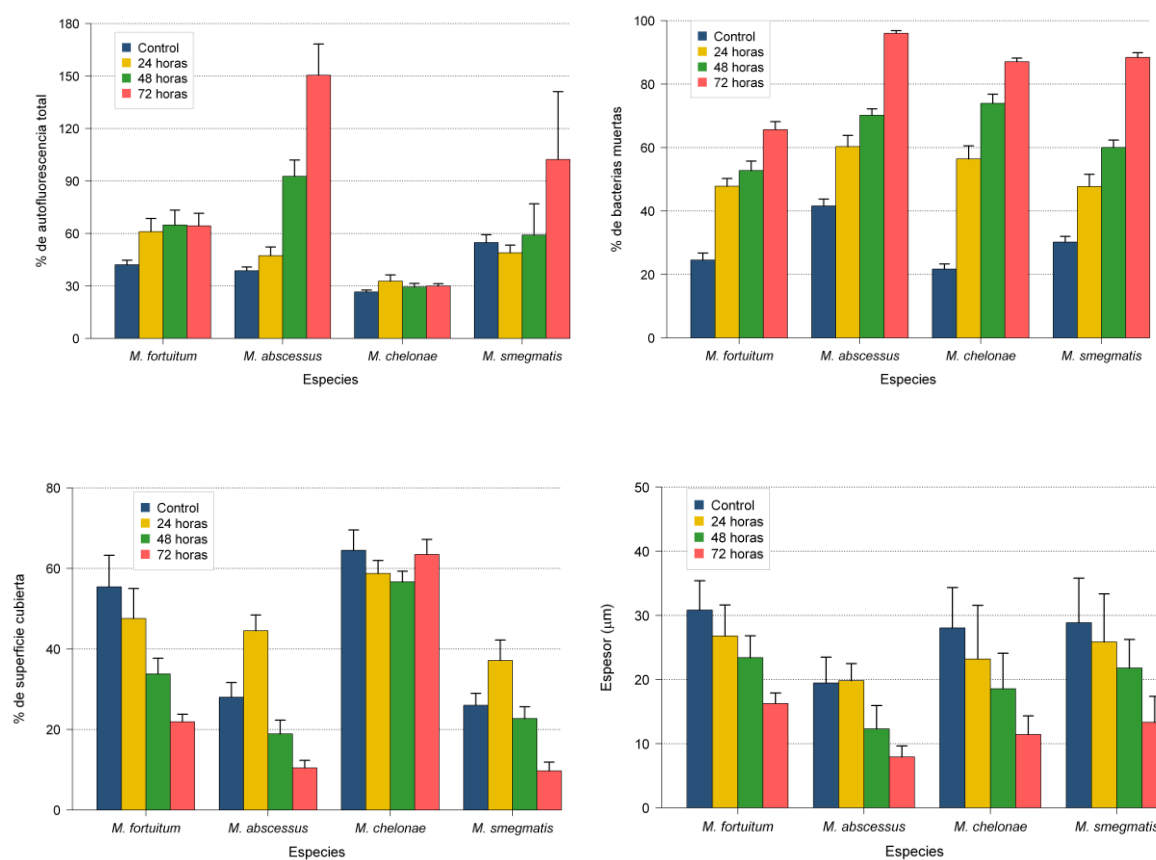


Figura 40. Efecto de amicacina-NAC en los diferentes parámetros medidos en la biopelícula de las diferentes especies de MNPCR.

a) Porcentaje de autofluorescencia

b) Porcentaje de bacterias muertas

c) Porcentaje de superficie cubierta

d) Espesor

Tiempo: horas de incubación con amicacina-NAC (24,48,72h) y control sin antibiótico (96h)

En la Tabla 41 se muestran los valores *p* obtenidos para cada uno de los parámetros y especies estudiadas según el test no paramétrico Mann-Whitney.

Tabla 41. Valores *p* obtenidos para cada uno de los parámetros y especies de MNPCR expuestas a amicacina-NAC según el test Mann-Whitney.

Especie	Comparaciones Tiempo (h)	% de superficie cubierta	% de bacterias muertas	Espesor	Autofluorescencia
<i>M. fortuitum</i>	24-48	0,1782	0,1930	0,0002*	0,7553
	24-72	0,0011*	0,0004*	<0,0001*	0,8428
	24-96	0,3186	<0,0001*	0,0001*	0,1600
	48-72	0,0145*	0,0085*	<0,0001*	0,7987
	48-96	0,0284*	<0,0001*	<0,0001*	0,1782
	72-96	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,0242*
<i>M. abscessus</i>	24-48	0,0007*	0,0221*	<0,0001*	0,0029*
	24-72	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,0003*
	24-96	0,0084*	0,0001*	0,3214	0,2587
	48-72	0,0140*	<0,0001*	<0,0001*	0,0301*
	48-96	0,0349*	<0,0001*	<0,0001*	0,0007*
	72-96	0,0004*	<0,0001*	<0,0001*	0,0002*
<i>M. chelonae</i>	24-48	0,5044	0,0072*	0,0096*	0,5422
	24-72	0,5053	<0,0001*	<0,0001*	0,8849
	24-96	0,3392	0,0001*	0,0005*	0,2587
	48-72	0,1394	0,0024*	<0,0001*	0,4687
	48-96	0,3690	<0,0001*	<0,0001*	0,6638
	72-96	0,9309	<0,0001*	<0,0001*	0,0993
<i>M. smegmatis</i>	24-48	0,0387*	0,0100*	0,0072*	0,5137
	24-72	0,0002*	<0,0001*	<0,0001*	0,5512
	24-96	0,1135	0,0007*	0,0387*	0,2415
	48-72	0,0011*	<0,0001*	<0,0001*	0,3474
	48-96	0,2913	<0,0001*	<0,0001*	0,1600
	72-96	0,0003*	<0,0001*	<0,0001*	0,7987

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

La media y desviación estándar para cada especie y para los diferentes parámetros según el tiempo de exposición a amicacina-NAC (24, 48, 72h), y control sin antibiótico (96h) vienen especificados en las Tablas 42-43.

Tabla 42. Espesor y % de bacterias muertas de MNPCR expuestas a amicacina-NAC.

Especie	Espesor (μm)				% de bacterias muertas			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	30,84 \pm 4,55	26,80 \pm 4,82	23,42 \pm 3,39	16,26 \pm 1,65	24,55 \pm 7,61	47,82 \pm 8,44	52,74 \pm 10,36	65,65 \pm 8,79
<i>M. abscessus</i>	19,47 \pm 4,03	19,83 \pm 2,66	12,32 \pm 3,63	7,93 \pm 1,72	41,59 \pm 7,51	60,31 \pm 12,19	70,18 \pm 6,92	96,00 \pm 2,99
<i>M. chelonae</i>	28,05 \pm 6,29	23,20 \pm 8,36	18,56 \pm 5,56	11,43 \pm 2,90	21,71 \pm 5,48	56,43 \pm 14,21	73,95 \pm 9,85	87,07 \pm 3,89
<i>M. smegmatis</i>	28,85 \pm 6,94	25,85 \pm 7,50	21,80 \pm 4,45	13,33 \pm 4,04	30,21 \pm 6,15	47,71 \pm 13,41	60,02 \pm 8,08	88,43 \pm 5,07

Tabla 43. % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR expuestas a amicacina-NAC.

Especie	% de superficie cubierta				% de autofluorescencia			
	Control (96h)	24h	48h	72h	Control (96h)	24h	48h	72h
<i>M. fortuitum</i>	55,42 \pm 27,14	47,53 \pm 25,87	33,79 \pm 13,49	21,99 \pm 6,43	42,14 \pm 8,86	61,09 \pm 25,93	64,84 \pm 29,27	64,31 \pm 24,87
<i>M. abscessus</i>	28,03 \pm 12,44	44,52 \pm 13,49	18,90 \pm 11,81	10,45 \pm 6,45	38,62 \pm 7,66	47,33 \pm 17,02	92,66 \pm 32,07	150,43 \pm 61,82
<i>M. chelonae</i>	64,49 \pm 17,45	58,75 \pm 11,14	56,64 \pm 9,22	63,47 \pm 12,88	26,52 \pm 3,75	32,77 \pm 12,27	29,36 \pm 7,21	29,92 \pm 4,61
<i>M. smegmatis</i>	26,00 \pm 10,26	37,13 \pm 17,54	22,69 \pm 10,16	9,72 \pm 7,48	54,76 \pm 15,63	48,93 \pm 15,15	59,11 \pm 61,71	102,25 \pm 134,52

5.5.7. Tablas comparativas del efecto de ciprofloxacino, ciprofloxacino-Tween y ciprofloxacino-NAC en la estructura de biopelículas de MNPCR

Tabla 44. Valores *p* obtenidos tras comparar el espesor y % de bacterias muertas de MNPCR entre ciprofloxacino (CIP), CIP+Tween y CIP+NAC según el test Mann-Whitney.

Especie	Espesor (μm)				% de bacterias muertas			
	Tiempo (h)	CIP vs. CIP+Tween	CIP vs. CIP+NAC	CIP+Tween vs. CIP+NAC	Tiempo (h)	CIP vs. CIP+Tween	CIP vs. CIP+NAC	CIP+Tween vs. CIP+NAC
<i>M. fortuitum</i>	24	<0,0001*	0,0014*	<0,0001*	24	0,5141	0,9424	0,0686
	48	<0,0001*	0,7806	<0,0001*	48	0,0951	0,2330	0,0119*
	72	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	72	0,4218	0,5363	0,1398
<i>M. abscessus</i>	24	<0,0001*	0,0059*	0,1184	24	0,0115*	0,0044*	0,1748
	48	0,0441*	0,0152*	0,9442	48	0,0503	0,0088*	0,2597
	72	0,0001*	0,4647	0,0016*	72	0,0111*	0,0113*	0,0029*
<i>M. chelonae</i>	24	<0,0001*	0,1822	<0,0001*	24	0,0505	0,5145	0,0050*
	48	<0,0001*	0,5164	<0,0001*	48	0,7172	0,2773	0,4349
	72	<0,0001*	0,0772	0,0002*	72	0,0112*	0,2786	0,9309
<i>M. smegmatis</i>	24	0,0014*	0,8345	0,0015*	24	0,2773	0,8264	1,0000
	48	0,0111*	<0,0001*	<0,0001*	48	0,2945	0,0176*	0,7987
	72	0,0011*	0,0063*	<0,0001*	72	0,6330	1,0000	0,5443

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

El espesor se ve reducido significativamente cuando se combina Tween 80 con ciprofloxacino en todas las especies estudiadas y a todos los tiempos. Esta reducción es mayor en todos los casos al compararlo con la combinación de ciprofloxacino-NAC. En el caso de NAC el espesor se ve incluso incrementado significativamente con respecto a ciprofloxacino en algunos casos, como ocurre a las 72h en *M. fortuitum*, y a las 48 y 72h en *M. smegmatis*.

El porcentaje de bacterias muertas se incrementa significativamente en *M. abscessus* a las 24, 48 y 72h con NAC, y a las 24 y 72h con Tween, siendo este incremento mayor en NAC especialmente a las 72h (2,7 veces con NAC, y 2,22 con Tween). De igual forma, disminuye significativamente con respecto a ciprofloxacino a las 72h en *M. chelonae* con Tween, y a las 48h en *M. smegmatis* con NAC.

Tabla 45. Valores *p* obtenidos tras comparar el % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR entre ciprofloxacino (CIP), CIP+Tween y CIP+NAC según el test Mann-Whitney.

Especie	% de superficie cubierta				% de autofluorescencia			
	Tiempo (h)	CIP vs. CIP+Tween	CIP vs. CIP+NAC	CIP+Tween vs. CIP+NAC	Tiempo (h)	CIP vs. CIP+Tween	CIP vs. CIP+NAC	CIP+Tween vs. CIP+NAC
<i>M. fortuitum</i>	24	0,2170	0,3648	0,5438	24	0,7165	0,8396	0,5438
	48	0,3468	1,0000	0,0529	48	0,8281	0,8396	0,2363
	72	0,0112*	0,5363	<0,0001*	72	0,0505	0,4484	0,0225*
<i>M. abscessus</i>	24	0,0937	0,1293	0,0100*	24	0,5118	0,6131	0,5056
	48	0,8278	0,6330	0,2361	48	0,3460	0,1363	0,1256
	72	0,0112*	0,1699	0,0035*	72	0,0957	0,1699	0,9309
<i>M. chelonae</i>	24	0,0115*	0,0088*	0,0998	24	1,0000	0,0703	0,7074
	48	0,0109*	0,0966	0,0016*	48	0,0689	0,3477	0,0011*
	72	0,0044*	0,0115*	0,0734	72	0,5363	0,3477	0,5443
<i>M. smegmatis</i>	24	0,9423	1,0000	0,0994	24	0,0112*	0,0960	0,7070
	48	0,2330	0,2182	0,1120	48	0,4484	0,3464	0,5440
	72	0,9451	0,6330	0,3864	72	0,9451	0,4484	0,3777

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

El porcentaje de superficie cubierta se ve reducido significativamente cuando se combina Tween 80 con ciprofloxacino en el caso de *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. chelonae*. Esta reducción es mayor en todos los casos al compararlo con la combinación de ciprofloxacino-NAC. NAC, aunque también presenta una disminución en el porcentaje de superficie cubierta al compararlo con ciprofloxacino, no es tan significativa como en el caso de Tween 80.

El porcentaje de autofluorescencia muestra ser un parámetro independiente. Se ve incrementado significativamente en el caso de *M. fortuitum* con Tween a las 72h y en *M. chelonae* a las 48h con NAC, y disminuido en *M. smegmatis* con Tween a las 24h.

5.5.8. Tablas comparativas del efecto de claritromicina, claritromicina-Tween y claritromicina-NAC en la estructura de biopelículas de MNPCR

Tabla 46. Valores *p* obtenidos tras comparar el espesor y % de bacterias muertas de MNPCR entre claritromicina (CLR), CLR+Tween y CLR+NAC según el test Mann-Whitney.

Especie	Espesor (μm)				% de bacterias muertas			
	Tiempo (h)	CLR vs. CLR+Tween	CLR vs. CLR+NAC	CLR+Tween vs. CLR+NAC	Tiempo (h)	CLR vs. CLR+Tween	CLR vs. CLR+NAC	CLR+Tween vs. CLR+NAC
<i>M. fortuitum</i>	24	<0,0001*	0,7637	<0,0001*	24	0,0168*	0,0088*	0,4701
	48	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	48	0,4256	0,2330	0,0020*
	72	<0,0001*	<0,0001*	0,0001*	72	0,4256	0,6330	0,0006*
<i>M. abscessus</i>	24	0,5403	0,0039*	0,0031*	24	0,8280	0,4484	0,0225*
	48	0,5943	0,1235	0,0361*	48	0,7180	0,3648	0,0141*
	72	0,0043*	0,0020*	0,3654	72	0,3477	0,0044*	0,0005*
<i>M. chelonae</i>	24	<0,0001*	<0,0001*	0,0368*	24	0,0044*	0,2195	0,8852
	48	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	48	0,0044*	0,1011	0,5512
	72	<0,0001*	0,0275*	<0,0001*	72	0,0044*	0,0044*	0,6707
<i>M. smegmatis</i>	24	<0,0001*	<0,0001*	0,0299*	24	0,6125	1,0000	0,6645
	48	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	48	0,6125	0,7341	0,0120*
	72	<0,0001*	0,0143*	<0,0001*	72	0,1661	0,0357*	0,0598

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

El espesor se ve reducido significativamente cuando se combina Tween 80 con claritromicina a las 24, 48 y 72h en *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. smegmatis*, y a las 72h en *M. abscessus*. Lo mismo sucede en el caso de NAC a las 24, 48 y 72h en *M. chelonae* y *M. smegmatis*, a las 48 y 72h en *M. fortuitum* y a las 72h en *M. abscessus*. Esta reducción es mayor en las combinaciones de claritromicina con Tween respecto a aquellas con NAC. Incluso, a las 24h en *M. abscessus*, el espesor aumenta significativamente al combinar NAC con claritromicina.

El porcentaje de bacterias muertas se incrementa significativamente en *M. fortuitum* a las 24h con NAC y Tween, en *M. abscessus* a las 72h sobre todo con NAC, en *M. chelonae* a las 24, 48 y 72h con Tween, y a las 72h con NAC, y en *M. smegmatis* a las 72h sobre todo con NAC.

Tabla 47. Valores *p* obtenidos tras comparar el % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR entre claritromicina (CLR), CLR+Tween y CLR+NAC según el test Mann-Whitney.

Especie	% de superficie cubierta				% de autofluorescencia			
	Tiempo (h)	CLR	CLR	CLR+Tween	Tiempo (h)	CLR	CLR	CLR+Tween
		vs. CLR+Tween	vs. CLR+NAC	vs. CLR+NAC		vs. CLR+Tween	vs. CLR+NAC	vs. CLR+NAC
<i>M. fortuitum</i>	24	0,1283	0,0484*	0,5440	24	0,0357*	0,1802	0,1406
	48	0,0113*	0,0176*	<0,0001*	48	0,6125	0,0308*	0,7507
	72	0,9451	0,6330	0,4776	72	0,6330	0,2330	0,6707
<i>M. abscessus</i>	24	0,7341	0,0709	0,0003*	24	0,2330	0,0044*	0,0387*
	48	0,7341	0,1363	0,0100*	48	0,1363	0,0088*	0,1277
	72	0,7175	0,7341	0,4022	72	0,0359*	0,1011	0,0024*
<i>M. chelonae</i>	24	0,0250*	0,0703	0,3406	24	0,0250*	0,1011	0,3706
	48	0,1011	0,1802	0,6033	48	0,3648	0,0088*	0,9774
	72	0,0044*	0,0044*	0,4428	72	0,5363	0,1363	0,0068*
<i>M. smegmatis</i>	24	1,0000	0,4484	0,0597	24	0,7341	0,8396	0,1005
	48	0,2945	1,0000	0,0519	48	0,0044*	0,0044*	0,5899
	72	0,3648	0,7341	0,1782	72	1,0000	1,0000	0,7125

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

El porcentaje de superficie cubierta se ve reducido significativamente a las 48h cuando se combina Tween 80 con claritromicina en *M. fortuitum*, y a las 24 y 72h en *M. chelonae*. De igual forma, a las 72h cuando se combina NAC con claritromicina en *M. chelonae*. Por otro lado, este parámetro se ve incrementado significativamente con NAC a las 24 y 48h en *M. fortuitum*, y a las 24 y 48h en *M. abscessus*.

El porcentaje de autofluorescencia muestra ser un parámetro independiente. Se ve incrementado significativamente en el caso de *M. abscessus* con Tween a las 72h, y disminuido significativamente en *M. fortuitum* a las 24h con Tween y a las 48 con NAC, al igual que en *M. abscessus* a las 24 y 48h con NAC, en *M. chelonae* a las 24h con Tween y a las 48h con NAC, y en *M. smegmatis* a las 48h con Tween y NAC.

5.5.9. Tablas comparativas del efecto de ampicilina, ampicilina-Tween y ampicilina-NAC en la estructura de biopelículas de MNPCR

Tabla 48. Valores *p* obtenidos tras comparar el espesor y % de bacterias muertas de MNPCR entre ampicilina (AN), AN+Tween y AN+NAC según el test Mann-Whitney.

Especie	Espesor (μm)				% de bacterias muertas			
	Tiempo (h)	AN vs. AN+Tween	AN vs. AN+NAC	AN+Tween vs. AN+NAC	Tiempo (h)	AN vs. AN+Tween	AN vs. AN+NAC	AN+Tween vs. AN+NAC
<i>M. fortuitum</i>	24	<0,0001*	0,8517	<0,0001*	24	0,0251*	0,0111*	0,2138
	48	<0,0001*	0,2019	<0,0001*	48	0,1011	0,1688	0,7072
	72	<0,0001*	0,4711	<0,0001*	72	0,0112*	0,0114*	0,9769
<i>M. abscessus</i>	24	0,6706	<0,0001*	<0,0001*	24	0,3455	0,3425	0,0595
	48	0,2164	0,2744	0,0020*	48	0,6128	0,0702	0,0004*
	72	0,2029	0,0004*	0,0001*	72	0,0503	0,0110*	<0,0001*
<i>M. chelonae</i>	24	0,0002*	<0,0001*	0,1010	24	0,1286	0,2186	0,0029*
	48	0,0982	0,0084*	<0,0001*	48	0,4193	0,0604	0,0001*
	72	0,0016*	0,0834	0,0089*	72	0,0088*	0,0112*	0,0005*
<i>M. smegmatis</i>	24	<0,0001*	<0,0001*	0,0288*	24	0,2773	0,7341	0,2141
	48	<0,0001*	0,0005*	<0,0001*	48	0,0110*	0,0044*	0,1118
	72	<0,0001*	<0,0001*	0,0033*	72	0,0308*	0,0112*	0,6647

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

El espesor se ve reducido significativamente cuando se combina Tween 80 con ampicilina en *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. smegmatis*. Esta reducción es mayor en todos los casos al compararlo con la combinación de ampicilina-NAC. En el caso de NAC el espesor se ve incluso incrementado significativamente con respecto a ampicilina en algunos casos, como ocurre a las 24 y 48h en *M. chelonae*.

El porcentaje de bacterias muertas se incrementa significativamente en *M. fortuitum* a las 24 y 72h con NAC y Tween, en *M. abscessus* a las 72h sobre todo con NAC, en *M. chelonae* a las 72h con Tween y en mayor medida con NAC, y en *M. smegmatis* a las 48 y 72h con NAC y Tween.

Tabla 49. Valores *p* obtenidos tras comparar el % de superficie cubierta y autofluorescencia de MNPCR entre amicacina (AN), AN+Tween y AN+NAC según el test Mann-Whitney.

Especie	% de superficie cubierta				% de autofluorescencia			
	Tiempo (h)	AN	AN	AN+Tween	Tiempo (h)	AN	AN	AN+Tween
		vs. AN+Tween	vs. AN+NAC	vs. AN+NAC		vs. AN+Tween	vs. AN+NAC	vs. AN+NAC
<i>M. fortuitum</i>	24	0,8278	0,0966	0,0042*	24	0,3464	0,4484	0,8851
	48	0,0308*	0,5363	0,0002*	48	0,6330	0,0703	0,1978
	72	0,4269	0,6330	0,0303*	72	0,4269	0,1011	0,0014*
<i>M. abscessus</i>	24	0,4248	0,8268	0,0002*	24	0,4248	0,7153	0,4339
	48	0,9421	0,8281	0,1929	48	0,5130	0,0704	0,0399*
	72	0,0245*	0,2773	0,0300*	72	0,0111*	0,0112*	0,0400*
<i>M. chelonae</i>	24	0,8396	0,3434	0,0016*	24	0,0176*	0,0239*	0,3697
	48	0,4484	0,1649	0,0011*	48	0,1011	0,0105*	0,0299*
	72	0,2330	0,0112*	0,0002*	72	0,1802	0,0112*	0,1745
<i>M. smegmatis</i>	24	0,0044*	0,0176*	0,3186	24	0,0484*	0,0308*	0,0387*
	48	0,1802	0,0484*	0,9323	48	0,5363	0,0484*	0,3777
	72	0,1802	0,5363	0,1600	72	0,4484	0,1011	0,8874

*Estadísticamente significativo ($p < 0,05$)

El porcentaje de superficie cubierta se ve reducido significativamente cuando se combina Tween 80 con amicacina en el caso de *M. fortuitum* y *M. abscessus*. Esta reducción es mayor en todos los casos al compararlo con la combinación de amicacina-NAC. Por otro lado, este parámetro se ve incrementado significativamente con NAC a las 72h en *M. chelonae* y a las 24 y 48h en *M. smegmatis*, y con Tween a las 24h en *M. smegmatis*.

El porcentaje de autofluorescencia muestra ser un parámetro independiente. Se ve incrementado significativamente en el caso de *M. fortuitum* con NAC a las 72h y en *M. abscessus* a las 48 y 72h con NAC, y a las 72h con Tween. Sin embargo, este parámetro se ve disminuido significativamente en *M. chelonae* a las 24h con Tween, y a las 24, 48 y 72h con NAC, al igual que en *M. smegmatis* a las 24h con Tween, y a las 24 y 48h con NAC.

6. DISCUSIÓN

Las infecciones por MNT se han convertido en un fenómeno emergente. De entre los múltiples factores implicados en el aumento de dichas infecciones destacan su ubicuidad en el medio ambiente, su alta capacidad de resistencia a antisépticos habituales, y el notable incremento de procedimientos invasivos, sobre todo cosméticos.

Las infecciones producidas por MNPCR incluyen una amplia gama de enfermedades, la mayoría de ellas causadas por las especies *M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*. El resto de especies raramente causan infección en humanos^{11, 123-124}, a pesar de su aislamiento relativamente común a partir de muestras clínicas^{9, 11, 332-334}. Estas infecciones patógenas están comúnmente relacionadas con biopelículas, e incluyen una gran variedad de complicaciones quirúrgicas que varían desde infecciones relativamente leves, como las infecciones de herida quirúrgica^{11, 335}, hasta muy graves como la endocarditis asociada a válvula protésica³³⁶⁻³³⁷. Entender, por lo tanto, el concepto de biopelícula es esencial a la hora de prevenir, diagnosticar y tratar las infecciones asociadas a la formación de estas estructuras. Estas comunidades microbianas presentan una serie de características que dificultan el manejo de dichas infecciones, como son su mayor resistencia a los agentes antimicrobianos, su capacidad de evasión y resistencia a los mecanismos inmunes, y a la dificultad de aislar estos microorganismos mediante métodos convencionales³³⁸.

Debido al aumento de infecciones relacionadas con la formación de biopelículas y a las diferencias importantes que existen en la evolución clínica de las diferentes especies de MNPCR, resulta importante conocer el comportamiento que presentan dichas bacterias *in vitro*.

6.1. Autofluorescencia en biopelículas de MNPCR

Respecto a la autofluorescencia, cabe destacar que todas las MNPCR estudiadas emiten autofluorescencia azul, lo que podría suponer una potencial herramienta diagnóstica. Dicha autofluorescencia es un parámetro independiente del tiempo y de la especie, y se considera específica de estas micobacterias al coincidir con aquellas teñidas mediante la tinción Nile Red[®], que se une específicamente a los lípidos de las células bacterianas (Figuras 25-26).

Se ha visto que el tratamiento con calor o agentes químicos decontaminantes no interfieren con la detección de autofluorescencia, sino que por el contrario incrementan el nivel de

detección de la misma. Patiño *et al.* especularon que las coenzimas F₄₂₀ o FO podrían estar implicadas en la autofluorescencia de micobacterias¹². Estas coenzimas son importantes para las reacciones de transferencia de electrones de micobacterias y tienen la capacidad de generar una fluorescencia azul-verde brillante que se ve reforzada por el tratamiento de calor. De acuerdo con nuestros resultados, esta molécula podría ser secretada por los componentes bacterianos de la biopelícula y detectarse en la matriz extracelular en forma de autofluorescencia. Otra hipótesis podría ser que esta coenzima se liberase después de la muerte celular durante la formación de la biopelícula. Cabe destacar que la detección preferente de la autofluorescencia extracelular tiene lugar al comienzo de la formación de la biopelícula por lo que podría ser un factor QS desconocido.

6.2. Estructura de las biopelículas de MNPCR en relación con la especie

La técnica de microscopía confocal es de referencia en el estudio de biopelículas⁷⁰, la cual combina el microscopio de fluorescencia con imagen electrónica. Esta técnica permite la visualización directa de la estructura de la biopelícula mediante tinciones fluorescentes como la tinción Nile Red[®] o Live/Dead Backlight[®], incluyendo el estudio de la viabilidad de las bacterias presentes en la biopelícula. Mediante CLSM analizamos el espesor, el porcentaje de superficie cubierta, el porcentaje de autofluorescencia (anteriormente comentado) y el porcentaje de bacterias muertas en las 7 cepas tipo de MNPCR más comunmente aisladas.

Tanto el espesor como la superficie cubierta aumentan a lo largo del desarrollo de formación de la biopelícula, destacando un efecto importante del tiempo y la especie en el espesor, y de solo la especie en el porcentaje de superficie cubierta. Llama la atención que el porcentaje de superficie cubierta sea mayor para las especies *M. fortuitum* y *M. abscessus*, patógenos humanos habituales. *M. chelonae* presenta un crecimiento más irregular y se caracteriza por crecer verticalmente, de ahí que presente un porcentaje de superficie cubierta no tan elevado.

El porcentaje medio de bacterias muertas disminuye a lo largo del desarrollo de formación de la biopelícula. Merece la pena resaltar que un mayor porcentaje de bacterias muertas se detecta en todas las micobacterias después de 24h de inoculación. No existe una explicación clara para este fenómeno, pero posiblemente el estrés al que están sometidas las bacterias al

principio del experimento o el período de adaptación requerido para formar células "clusters", que maduran y se desprenden de la biopelícula para colonizar otras superficies, podrían ser las principales causas potenciales.

Mediante CLSM también visualizamos que ciertas MNPCR estudiadas presentan cordones. Williams *et al.* demostró que la presencia de cordones está asociado con una mayor patogenicidad de las especies de micobacterias²⁰. Así, por ejemplo, está descrito que la variante rugosa (R) de *M. abscessus*, carente de GPLs en la superficie celular, es más patógena que la variante lisa (L). La virulencia de la variante R se asocia a la producción masiva de cordones y a la formación de abscesos. Un estudio reciente realizado por Bernut *et al.* relaciona el aumento de la virulencia de la variante R con la pérdida de la producción de GPLs mediante estudios en embriones de pez cebra¹⁹. Este estudio describe el papel fundamental de dichos cordones en la fisiopatología *in vivo* de la infección por *M. abscessus* y enfatiza que es un mecanismo de evasión inmune.

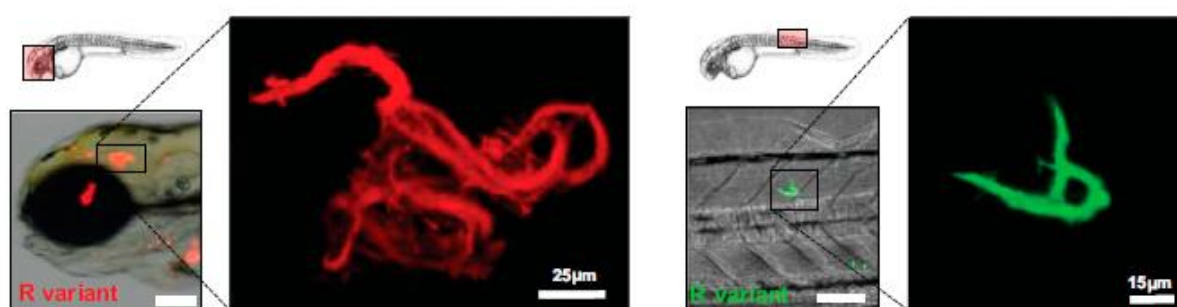


Figura 41. Cordones de *M. abscessus* en cabeza y cola del pez cebra mediante microscopía confocal.

Imagen obtenida en *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci Bernut et al.* 2014.

En concreto, detectamos esta propiedad en *M. chelonae* y *M. abscessus*, ambas consideradas las especies más patógenas de este grupo¹⁰, y también en otras especies consideradas menos patógenas como *M. mucogenicum* y *M. smegmatis*.

En un artículo publicado recientemente por Kumar *et al.* en la revista *Ultrastructural Pathology*, se recogen datos importantes sobre los cambios morfológicos ultraestructurales

experimentados en biopelículas de *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. fortuitum* y *M. tuberculosis*, observándose cómo *M. smegmatis* también se dispone en cordones³³⁹.

6.3. Sensibilidad y efecto de antibióticos en biopelículas de MNPCR

El tratamiento de las infecciones por MCR es diferente al de la tuberculosis y otras micobacteriosis. Incluye la administración de antibióticos, de acuerdo con los patrones de sensibilidad, y la actuación quirúrgica en algunos casos como linfadenitis o infecciones de piel y tejidos blandos³⁴⁰. Las MCR son resistentes a los fármacos antituberculosos convencionales pero pueden ser sensibles a otros antimicrobianos de amplio espectro. La gran variabilidad en la respuesta antibiótica de las diferentes especies motiva la necesidad de identificar correctamente cada aislado clínico y determinar su sensibilidad *in vitro*. Los antimicrobianos que se suelen ensayar incluyen los macrólidos, los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas, cefoxitina, imipenem, linezolid, tigeciclina, doxiciclina, minociclina y trimetoprima-sulfametoxazol.

La formación de biopelículas es un factor de patogenicidad clave para la supervivencia en diversos ambientes ya que permite a las células sobrevivir en ambientes hostiles y también colonizar nuevos nichos³⁴¹. Se ha visto que una biopelícula puede desarrollarse en 24h después de la colocación de los dispositivos³⁴². La mayor importancia de la presencia de biopelículas en infecciones radica en que es un factor fundamental en la resistencia de los microorganismos embebidos en su matriz a antibióticos, desinfectantes y germicidas³⁴³⁻³⁴⁴. Como consecuencia, puede provocar fracasos terapéuticos y la experiencia clínica ha demostrado que las biopelículas deben ser erradicadas físicamente para que la infección se pueda resolver³⁴³.

Los aislados de las especies *M. fortuitum*, *M. smegmatis* y *M. mucogenicum* son normalmente los más sensibles (comúnmente sensibles a amikacina, cefoxitina, imipenem, ciprofloxacino, sulfonamidas y moxifloxacino)¹¹. Por el contrario, *M. abscessus* y *M. chelonae* son las especies de MCR más resistentes a los antimicrobianos, siendo generalmente sensibles o intermedios a amikacina, imipenem y claritromicina, y resistentes a quinolonas¹¹.

En nuestros experimentos cabe destacar la resistencia a CLR en *M. mageritense* ATCC 700351 (CMI) (Tabla 12). Estudios recientes muestran que hay especies de MCR que tienen una

resistencia intrínseca a claritromicina, estando dicha resistencia directamente relacionada con la presencia de genes *erm*. Estudios previos en relación con la detección de genes de metilasas *erm* realizados en la Fundación Jiménez Díaz demostraron que esta cepa de colección presenta dicho gen^{207, 345}, de ahí su resistencia intrínseca a macrólidos.

El método CBD, para estudiar la sensibilidad en biopelículas, es una técnica utilizada en multitud de estudios³⁴⁶⁻³⁴⁸, y a pesar de no existir un método estandarizado para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana en biopelículas, este método parece ser el más adecuado, ya que permite la formación de biopelículas equivalentes y es altamente reproducible.

En nuestros experimentos observamos una resistencia muy elevada a antimicrobianos (ciprofloxacino, amicacina y claritromicina) en todas las MNPCR estudiadas cuando se encuentran formando biopelículas (CMEB) (Tabla 12). De entre los antimicrobianos estudiados, ciprofloxacino resultó ser el más activo frente a biopelículas de MNPCR, mientras que claritromicina y amicacina no mostraron prácticamente actividad frente a las mismas. De acuerdo con nuestros resultados se puede concluir que las MNPCR, cuando se encuentran formando parte de una biopelícula, presentan una resistencia a antimicrobianos muy superior respecto a las micobacterias en estado planctónico. Esta resistencia varía desde en torno a 100 veces en el caso de *M. mucogenicum* cuando se expone a ciprofloxacino, hasta >100.000 veces más con respecto a la CMI en el caso de *M. abscessus* y *M. peregrinum* cuando se exponen a claritromicina.

El mecanismo de acción puede estar relacionado con dichos resultados, ya que ciprofloxacino tiene un mecanismo de acción diferente al de amicacina y claritromicina. Ciprofloxacino inhibe la síntesis de ADN y es bactericida (posee la propiedad de destruir la bacteria), siendo su acción terapéutica irreversible. Los aminoglucósidos como amicacina, aunque también son bactericidas, por el contrario inhiben la síntesis de proteínas. Además, los aminoglucósidos son considerados en general poco activos frente a microorganismos que crecen formando biopelículas porque son retenidos por cargas negativas del alginato (polisacárido aniónico de la pared celular bacteriana). Por su parte, claritromicina inhibe la síntesis proteica y es bacteriostático (inhibe la multiplicación bacteriana).

Existen algunos estudios en la literatura donde se recoge que el número de micobacterias en biopelícula puede alcanzar recuentos tan elevados de en torno a 10.000-100.000 UFC/cm²,

como bien describen Falkinham *et al.* en diferentes artículos^{15, 90}. Este dato tendría que tenerse en cuenta a la hora de plantear las opciones terapéuticas en infecciones causadas por MCR asociadas a la formación de biopelículas.

El amplio espectro de resistencia de las micobacterias a antibióticos y desinfectantes es causado, en parte, por la velocidad de crecimiento de las mismas, por su hidrofobicidad e impermeabilidad^{15, 21}. Esta resistencia también está relacionada con proteínas de transporte asociadas a membrana que median el flujo de salida de antibióticos (por ejemplo, quinolonas) de las células³⁴⁹⁻³⁵⁰. Adicionalmente, entre los mecanismos de resistencia también se incluyen la presencia de β -lactamasas³⁵¹⁻³⁵², aminoglucósido-acetiltransferasas³⁵³ y genes de resistencia para tetraciclinas³⁵⁴. Debido a la resistencia constitutiva de alto nivel de las micobacterias a antibióticos, la identificación de mecanismos de resistencia específicos resulta complicado.

Mediante CLSM observamos cómo se comportaban los antibióticos ciprofloxacino, claritromicina y amicacina en las biopelículas de 3 micobacterias potencialmente patógenas (*M. fortuitum*, *M. chelonae* y *M. abscessus*), tomando *M. smegmatis* como control. El espesor es el parámetro más afectado en este estudio (Tabla 22), y una explicación a ello podría ser que durante las fases de maduración y dispersión que tienen lugar en la formación de biopelículas es más fácil eliminar las bacterias localizadas en la matriz de la biopelícula. Dichas bacterias son las que se liberan para colonizar nuevas superficies y, dado que presentan un metabolismo activo, pueden ser más vulnerables que otras bacterias que se encuentran dentro de la estructura de la biopelícula. Además, el hecho de que las capas superficiales de la biopelícula están más expuestas a dosis letales de antibiótico también podría explicar estos resultados. Adicionalmente, se observan diferencias estadísticamente significativas en el espesor de todas las especies, destacándose menores espesores en el caso de *M. fortuitum* con amicacina y ciprofloxacino, en *M. abscessus* con amicacina y claritromicina, en *M. chelonae* con amicacina, y en *M. smegmatis* con ciprofloxacino.

Como era de esperar, el porcentaje de bacterias muertas aumenta después de la exposición a antibióticos, sobre todo tras 48 y 72h de exposición antibiótica (Figura 42), a excepción de *M. fortuitum* y *M. chelonae* tras ser expuestas a amicacina (Tabla 20), pudiendo estar relacionado dicho efecto a una menor actividad de los aminoglucósidos sobre este parámetro en las biopelículas de estas especies micobacterianas. En el caso de *M. fortuitum* y

M. chelonae con ciprofloxacino, *M. fortuitum* con claritromicina, y *M. fortuitum* y *M. chelonae* con amicacina tras 24h de exposición antibiótica llama la atención la presencia de un porcentaje medio de bacterias muertas tan solo un poco más bajo que los controles (Tablas 14, 17 y 20). Entre las hipótesis barajadas se incluye la madurez de la biopelícula cuando añadimos el antibiótico. En este punto la biopelícula presenta micobacterias metabólicamente inactivas que han demostrado ser más resistentes a los antibióticos que aquellas metabólicamente activas.

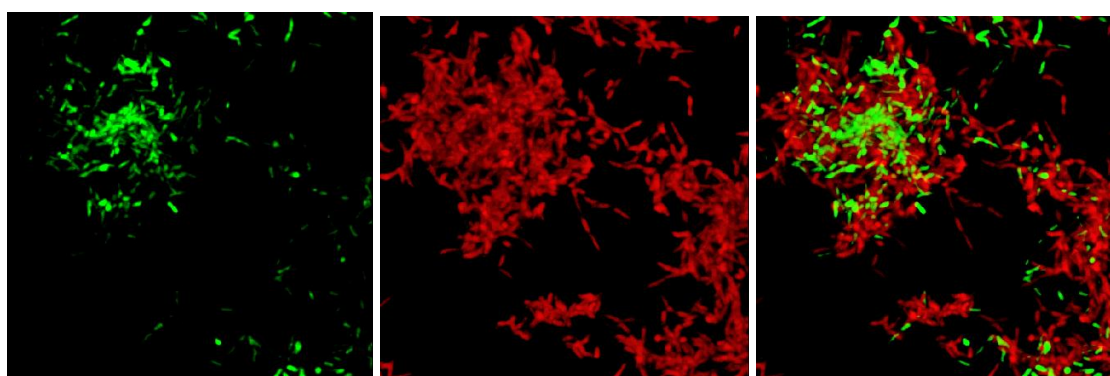


Figura 42. *M. chelonae* tras la exposición 72h con ciprofloxacino.

a) Bacterias vivas	b) Bacterias muertas	c) Superposición a) y b)
--------------------	----------------------	--------------------------

Cuando comparamos los resultados promedio de superficie cubierta observamos que este parámetro se reduce especialmente tras 48 y 72h de exposición antibiótica. Destaca que, al comparar los controles con las cepas tratadas 24h con antibiótico, dicho parámetro no varía prácticamente o incluso aumenta. Tal vez durante los primeros pasos de la formación de biopelículas, la fase de adherencia y la unión irreversible, es más difícil separar las células de la superficie debido, por ejemplo, a la presencia de cationes divalentes que juegan un papel muy importante en la adherencia microbiana y en la formación de biopelículas mediante estímulo de la adhesión célula-célula y la agregación. En el caso de *M. chelonae* el porcentaje de superficie cubierta aumenta significativamente tras la exposición 72h con claritromicina con respecto al control ($p=0,0496$) (Tabla 18).

Respecto al porcentaje de autofluorescencia podemos decir que se trata de un parámetro independiente, ya que disminuye o aumenta en algunas especies y con algunos antibióticos, sin seguir una tendencia definida. Respecto a la especie *M. smegmatis* cabe destacar la

presencia de autofluorescencia extracelular con amicacina, que podría deberse a un factor de estrés debido a la exposición antibiótica (Tabla 21).

6.4. Efecto de antibióticos en combinación junto a agentes antibiopelícula en biopelículas de MNPCR

El aumento de la resistencia múltiple a los antibióticos trae como consecuencia el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas. En los últimos años se están estudiando posibles alternativas a los antibióticos, su modo de acción y efectos sinérgicos con otros compuestos antimicrobianos³⁵⁵.

Tween 80 está descrito como agente antibiopelícula³²⁹, al igual que NAC. Este último es un agente importante en la prevención de la adhesión de bacterias a los dispositivos de biomateriales³²⁵ y, dadas sus propiedades antibacterianas, se emplea generalmente en el tratamiento médico de la bronquitis crónica³⁵⁶.

No existe experiencia de estos agentes en biopelículas formadas por micobacterias. En nuestros experimentos, NAC y Tween 80 muestran propiedades antibacterianas cuando se combinan con antibióticos y no cuando se adicionan solos. Esto se debe a que Tween 80, al ser un detergente no iónico, no tiene actividad antimicrobiana *per se*. Por su parte, NAC solo ejerce un papel mucolítico, empleándose de forma rutinaria en los laboratorios en la licuación y descontaminación de esputos para la recuperación de las especies del género *Mycobacterium*.

En el presente estudio quiso observarse si existía algún efecto sinérgico al combinar NAC y Tween 80 con los distintos antimicrobianos. Observando los valores de CMEB de las combinaciones de antibiótico con agentes antibiopelícula en MNPCR (Tabla 25), cabe destacar la importante reducción en la CMEB en el caso de *M. fortuitum* al asociar amicacina y NAC, y en el caso de *M. smegmatis* con ciprofloxacino y Tween, amicacina y Tween, ciprofloxacino y NAC, y amicacina y NAC. Este efecto sinérgico podría tener un potencial uso en profilaxis o tratamiento de infecciones relacionadas con biopelículas.

M. abscessus y *M. chelonae* son más resistentes a antimicrobianos que otras MCR, siendo especialmente resistentes a quinolonas, de ahí que se observen unas altas resistencias a ciprofloxacino y combinaciones del mismo. Más aún, *M. abscessus* es considerada una de las

especies más virulentas y resistentes de micobacterias de crecimiento rápido, por lo que las resistencias observadas en nuestros estudios de sensibilidad a antimicrobianos y agentes antibiopelícula apoyan dicha afirmación.

Por otro lado, *M. fortuitum* y *M. smegmatis* son generalmente más sensibles que el resto de MCR, de ahí que posiblemente en nuestro caso se vean concentraciones más disminuidas en estas especies para ciprofloxacino y amicacina.

En general, al asociar antibióticos con NAC o Tween el porcentaje de bacterias muertas se incrementa con respecto al uso solamente de antibióticos. Solo en algunas combinaciones puntuales con ciprofloxacino este parámetro se ve disminuido significativamente (con Tween a las 72h en *M. chelonae*, y con NAC a las 48h en *M. smegmatis*) (Tabla 44), posiblemente debido a la estructura más irregular de estas especies. Por otro lado, el porcentaje de autofluorescencia no sigue una tendencia definida, por lo que lo consideramos como un parámetro independiente. Cabe destacar la presencia de autofluorescencia extracelular en *M. smegmatis* con las combinaciones de amicacina y Tween (Tabla 40), y con amicacina y NAC (Tabla 43), en *M. abscessus* con amicacina y NAC (Tabla 43), y en *M. fortuitum* con claritromicina y Tween (Tabla 34). Ello podría deberse a que se tratase de un factor de estrés y que estuviese relacionado con la exposición antibiótica junto con los agentes antibiopelícula.

Las combinaciones antibióticas con el desinfectante tensioactivo Tween 80 muestran en todos los casos unas reducciones en el porcentaje de superficie cubierta y en el espesor más altas que con el agente mucolítico NAC. Hemos visto que en algunos casos el espesor y el porcentaje de superficie cubierta se ven incrementados al combinar NAC con antibióticos. Destacamos incrementos en el espesor con ciprofloxacino a las 72h en *M. fortuitum*, y a las 48 y 72h en *M. smegmatis* (Tabla 44), con claritromicina a las 24h en *M. abscessus* (Tabla 46), y con amicacina a las 24 y 48h en *M. chelonae* (Tabla 48). De igual forma, destaca un aumento en el porcentaje de superficie cubierta con claritromicina a las 24 y 48h en *M. fortuitum* y a las 24 y 48h en *M. abscessus* (Tabla 47), y con amicacina a las 72h en *M. chelonae* y a las 24 y 48h en *M. smegmatis* (Tabla 49). Dichos resultados, atribuibles teóricamente a un efecto directo sobre la envoltura celular bacteriana, tienen su razón en el mecanismo de acción de estos agentes antibiopelícula.

Tween 80, al ser un detergente, tiene el potencial de alterar la integridad estructural de la membrana (es decir, la disposición ordenada de lípidos y proteínas), interfiriendo con procesos de transporte y metabolismo energético y salida de pequeñas moléculas de la célula³⁵⁷. Por su parte, NAC es un derivado de la cisteína y, por lo tanto, su mecanismo de acción físico-químico es atribuible a la presencia en su composición de una molécula de un grupo sulfhidrilo libre que interactúa con los enlaces S-S de las cadenas mucoproteicas provocando su separación y determinando la disminución de su viscosidad. Así, actúa sobre el polisacárido de la matriz de la biopelícula, ejerciendo un efecto despolimerizante sobre las fibras de ADN y rompiendo los puentes disulfuros que enlazan las fibras de polisacáridos^{356, 358}. Dado el alto contenido lipídico de la pared celular micobacteriana (ácidos micólicos), su importancia en la composición de la matriz extracelular²⁴⁰, y la acción sobre los lípidos que ejerce Tween 80, podemos entender por qué éste es un agente antibiopelícula más activo que NAC en biopelículas formadas por micobacterias.

Poco se sabe sobre la complejidad de la estructura de la biopelícula micobacteriana, pero los estudios recientes muestran que las características de estas estructuras son diferentes de las detectadas en las biopelículas formadas por otros organismos.

Es necesario continuar la evaluación de los efectos causados por los diferentes antibióticos y agentes antibiopelícula con el objetivo de dilucidar cómo se ven afectadas las biopelículas. Este conocimiento podría ser de gran utilidad para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que puedan enfocar así un mejor tratamiento de las infecciones producidas por micobacterias.

7. CONCLUSIONES

1. Todas las cepas de MNPCR estudiadas, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. mageritense*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum* y *M. smegmatis*, presentan autofluorescencia al visualizarlas mediante microscopía confocal láser de barrido. Dicha fluorescencia intrínseca se observa tanto dentro de las células como en la matriz extracelular y la emisión fluorescente en $\lambda=450-480$ nm se caracteriza por ser de color azul cuando se excita con láser diode de $\lambda=405$ nm.
2. A lo largo del desarrollo de formación de biopelículas por las cepas de MNPCR estudiadas observamos que ni el tiempo ni la especie tienen un efecto relevante en el parámetro autofluorescencia pero sí en el parámetro espesor, el cual se ve incrementado 0,14 veces por cada hora adicional. El tiempo es un factor relevante en el porcentaje de bacterias muertas, viéndose reducido 0,15 veces por cada hora adicional, y la especie en el porcentaje de superficie cubierta. Destaca *M. chelonae* por su tendencia a crecer de forma vertical, presentando así un menor porcentaje de superficie cubierta, y *M. fortuitum* por presentar un mayor valor de este parámetro con respecto al resto de MNPCR.
3. Las biopelículas de *M. chelonae*, *M. mucogenicum* y *M. smegmatis* tienen un crecimiento más irregular mientras que las biopelículas de *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. mageritense* y *M. peregrinum* un crecimiento más uniforme.
4. La formación de cordones ha sido observada tanto en especies consideradas patógenos humanos habituales (*M. abscessus* y *M. chelonae*) como en patógenos humanos infrecuentes (*M. mucogenicum* y *M. smegmatis*).
5. Las MNPCR muestran una resistencia a antimicrobianos cuando se encuentran formando parte de una biopelícula (CMEB) muy superior respecto a las micobacterias en estado planctónico (CMI).
6. Ciprofloxacino es el antibiótico más activo frente a biopelículas preformadas de MNPCR, mientras que claritromicina y ampicilina carecen de actividad frente a las mismas.

7. El espesor es el parámetro más afectado tras la adición de los antibióticos ciprofloxacino, claritromicina y ampicilina a distintos tiempos durante la formación de la biopelícula. *M. fortuitum* presenta un espesor menor con ampicilina y ciprofloxacino, *M. abscessus* con ampicilina y claritromicina, *M. chelonae* con ampicilina, y *M. smegmatis* con ciprofloxacino.
8. El porcentaje de superficie cubierta se reduce especialmente tras 48 y 72h de exposición antibiótica, pero no así tras 24h, donde prácticamente no varía o aumenta.
9. La autofluorescencia se reduce significativamente tras 72h de exposición antibiótica en *M. smegmatis* con ciprofloxacino y claritromicina, en *M. abscessus* con claritromicina, y en *M. fortuitum* con ampicilina. De igual forma dicho parámetro aumenta significativamente en *M. chelonae* y *M. smegmatis* tras 72h de exposición a ampicilina. Además, se detecta la presencia de autofluorescencia extracelular en *M. smegmatis* con ampicilina.
10. El porcentaje de bacterias muertas aumenta después de la exposición a antibióticos, especialmente tras las 48 y 72h, a excepción de *M. fortuitum* y *M. chelonae* tras ser expuestas a ampicilina. En el caso de *M. fortuitum* y *M. chelonae* con ciprofloxacino, *M. fortuitum* con claritromicina, y *M. fortuitum* y *M. chelonae* con ampicilina tras 24h de exposición antibiótica, el porcentaje medio de bacterias muertas es inferior al de los controles.
11. NAC y Tween 80 no muestran propiedades antibacterianas cuando se emplean solos frente a MNPCR. Sin embargo, en combinación con antibióticos sí presentan propiedades antibacterianas, ejerciendo un efecto sinérgico en el incremento del porcentaje de bacterias muertas, y en la reducción de la superficie cubierta y del espesor de las biopelículas de MNPCR en estudio. Por lo tanto, estos compuestos se consideran agentes antibiopelícula.
12. El porcentaje de autofluorescencia es un parámetro independiente y no sigue una tendencia definida cuando se combinan Tween 80 y NAC con ciprofloxacino, ampicilina o claritromicina. Se detecta la presencia de autofluorescencia extracelular en *M. smegmatis* con las combinaciones de ampicilina con Tween y NAC, en *M. abscessus* con ampicilina y NAC, y en *M. fortuitum* con claritromicina y Tween.

13. El detergente Tween 80 en combinación con antibióticos reduce el porcentaje de superficie cubierta y el espesor de las biopelículas de MNPCR en estudio en mayor medida que el agente mucolítico NAC.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. van Ingen J, Boeree MJ, Dekhuijzen PN et al. Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. *Clin Microbiol Infect* 2009; **15**: 888-93.
2. Falkinham JO, 3rd. Factors influencing the chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Appl Environ Microbiol* 2003; **69**: 5685-9.
3. Bardouniotis E, Huddleston W, Ceri H et al. Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium phlei* using the MBEC assay system. *FEMS Microbiol Lett* 2001; **203**: 263-7.
4. Sanudo A, Vallejo F, Sierra M et al. Nontuberculous mycobacteria infection after mesotherapy: preliminary report of 15 cases. *Int J Dermatol* 2007; **46**: 649-53.
5. Falkinham JO, 3rd. Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 419-24.
6. Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ, Jr. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am Rev Respir Dis* 1993; **147**: 1271-8.
7. Kothavade RJ, Dhurat RS, Mishra SN et al. Clinical and laboratory aspects of the diagnosis and management of cutaneous and subcutaneous infections caused by rapidly growing mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; **32**: 161-88.
8. El Helou G, Viola GM, Hachem R et al. Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 166-74.
9. Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Fernandez AI et al. Epidemiology of infections due to nonpigmented rapidly growing mycobacteria diagnosed in an urban area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; **27**: 951-7.
10. De Groote MA, Huitt G. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 1756-63.
11. Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2002; **15**: 716-46.
12. Patino S, Alamo L, Cimino M et al. Autofluorescence of mycobacteria as a tool for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 3296-302.
13. Griffith DE, Brown-Elliott BA, Langsjoen B et al. Clinical and molecular analysis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; **174**: 928-34.
14. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ, Jr. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2012; **25**: 545-82.
15. Falkinham JO, 3rd. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med* 2002; **23**: 529-51.

16. Pinheiro JC, Bates DM, DebRoy S et al. NLME: linear and nonlinear mixed effects models. R package, version 3.1-79. 2006.
17. Woods GL, Brown-Elliott BA, Desmond EP et al. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard. Document M24-A. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Wayne, PA. 2003.
18. Ceri H, Olson ME, Stremick C et al. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 1771-6.
19. Bernut A, Herrmann JL, Kissa K et al. Mycobacterium abscessus cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014.
20. Williams MM, Yakus MA, Arduino MJ et al. Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2009; **75**: 2091-8.
21. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 1995; **64**: 29-63.
22. Euzéby JP. List of bacterial names with standing in nomenclature: Mycobacterium. <http://www.bacterio.net/mycobacterium.html> (September 2014, date last accessed).
23. Arend SM, van Soolingen D, Ottenhoff TH. Diagnosis and treatment of lung infection with nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Pulm Med* 2009; **15**: 201-8.
24. Asimwe BB, Bagyenzi GB, Ssengooba W et al. Species and genotypic diversity of non-tuberculous mycobacteria isolated from children investigated for pulmonary tuberculosis in rural Uganda. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 88.
25. Behr MA, Falkinham JO, 3rd. Molecular epidemiology of nontuberculous mycobacteria. *Future Microbiol* 2009; **4**: 1009-20.
26. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 2003; **16**: 319-54.
27. Falkinham JO. Impact of human activities on the ecology of nontuberculous mycobacteria. *Future Microbiol* 2010; **5**: 951-60.
28. Esteban J, Garcia-Pedrazuela M, Munoz-Egea MC et al. Current treatment of nontuberculous mycobacteriosis: an update. *Expert Opin Pharmacother* 2012; **13**: 967-86.
29. McGrath EE, Blades Z, McCabe J et al. Nontuberculous mycobacteria and the lung: from suspicion to treatment. *Lung* 2010; **188**: 269-82.
30. Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis* 1979; **119**: 107-59.
31. Falkinham JO, 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 1996; **9**: 177-215.
32. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; **175**: 367-416.

33. Wang L, Noertjojo K, Elwood RK et al. Tuberculosis among aboriginal and nonaboriginal persons in British Columbia. *Can Respir J* 2000; **7**: 151-7.
34. Moonan PK, Quitugua TN, Pogoda JM et al. Does directly observed therapy (DOT) reduce drug resistant tuberculosis? *BMC Public Health* 2011; **11**: 19.
35. Carson LA, Cusick LB, Bland LA et al. Efficacy of chemical dosing methods for isolating nontuberculous mycobacteria from water supplies of dialysis centers. *Appl Environ Microbiol* 1988; **54**: 1756-60.
36. Pelletier PA, du Moulin GC, Stottmeier KD. Mycobacteria in public water supplies: comparative resistance to chlorine. *Microbiol Sci* 1988; **5**: 147-8.
37. Taylor RH, Falkinham JO, 3rd, Norton CD et al. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol* 2000; **66**: 1702-5.
38. Teng R, Dick T. Isoniazid resistance of exponentially growing *Mycobacterium smegmatis* biofilm culture. *FEMS Microbiol Lett* 2003; **227**: 171-4.
39. Carson LA, Petersen NJ, Favero MS et al. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Appl Environ Microbiol* 1978; **36**: 839-46.
40. Da Mata Jardim O, Hernandez-Perez R, Corrales H et al. [Follow-up on an outbreak in Venezuela of soft-tissue infection due to *Mycobacterium abscessus* associated with Mesotherapy]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; **28**: 596-601.
41. Piersimoni C, Scarparo C. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerg Infect Dis* 2009; **15**: 1351-8; quiz 544.
42. Cho HJ, Lee DY, Lee JH et al. A case of *Mycobacterium abscessus* skin infection caused by multiple acupuncture. *Clin Exp Dermatol* 2010; **35**: 444-5.
43. Guevara-Patino A, Sandoval de Mora M, Farreras A et al. Soft tissue infection due to *Mycobacterium fortuitum* following acupuncture: a case report and review of the literature. *J Infect Dev Ctries* 2010; **4**: 521-5.
44. Gnatta JR, Kurebayashi LF, Paes da Silva MJ. Atypical mycobacterias associated to acupuncture: an integrative review. *Rev Lat Am Enfermagem* 2013; **21**: 450-8.
45. Lee WJ, Kang SM, Sung H et al. Non-tuberculous mycobacterial infections of the skin: a retrospective study of 29 cases. *J Dermatol* 2010; **37**: 965-72.
46. Thibeaut S, Levy PY, Pelletier ML et al. *Mycobacterium conceptionense* infection after breast implant surgery, France. *Emerg Infect Dis* 2010; **16**: 1180-1.
47. Kim JK, Kim TY, Kim DH et al. Three cases of primary inoculation tuberculosis as a result of illegal acupuncture. *Ann Dermatol* 2010; **22**: 341-5.
48. Tiwari TS, Ray B, Jost KC, Jr. et al. Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzalkonium chloride. *Clin Infect Dis* 2003; **36**: 954-62.

49. Russell CD, Claxton P, Doig C et al. Non-tuberculous mycobacteria: a retrospective review of Scottish isolates from 2000 to 2010. *Thorax* 2013.
50. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am* 1959; **43**: 273-90.
51. Colombo RE, Olivier KN. Diagnosis and treatment of infections caused by rapidly growing mycobacteria. *Semin Respir Crit Care Med* 2008; **29**: 577-88.
52. Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Kinnari TJ et al. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *BMC Microbiol* 2008; **8**: 184.
53. Esteban J, Gadea I, Zamora N et al. [Assessment of the invasiveness of rapidly-growing nonpigmented mycobacteria with the fibroblast microcolony assay]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; **24**: 551-5.
54. Amir J. Non-tuberculous mycobacterial lymphadenitis in children: diagnosis and management. *Isr Med Assoc J* 2010; **12**: 49-52.
55. Asimwe BB, Asimwe J, Kallenius G et al. Molecular characterisation of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle carcasses at a city slaughterhouse in Uganda. *Vet Rec* 2009; **164**: 655-8.
56. Muwonge A, Kankya C, Godfroid J et al. Prevalence and associated risk factors of mycobacterial infections in slaughter pigs from Mubende district in Uganda. *Trop Anim Health Prod* 2010; **42**: 905-13.
57. Marras TK, Daley CL. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med* 2002; **23**: 553-67.
58. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO, 3rd. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2004; **17**: 98-106.
59. Alvarez-Uria G. Lung disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Pulm Med* 2010; **16**: 251-6.
60. Kankya C, Muwonge A, Djonje B et al. Isolation of non-tuberculous mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda: public health significance. *BMC Public Health* 2011; **11**: 320.
61. Chilima BZ, Clark IM, Floyd S et al. Distribution of environmental mycobacteria in Karonga District, northern Malawi. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 2343-50.
62. Schulze-Robbecke R, Buchholtz K. Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Appl Environ Microbiol* 1992; **58**: 1869-73.
63. Steed KA, Falkinham JO, 3rd. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 4007-11.
64. Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A et al. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 2002; **68**: 5318-25.
65. Selvaraju SB, Khan IU, Yadav JS. Biocidal activity of formaldehyde and nonformaldehyde biocides toward *Mycobacterium immunogenum* and *Pseudomonas fluorescens* in pure and mixed suspensions in synthetic metalworking fluid and saline. *Appl Environ Microbiol* 2005; **71**: 542-6.

66. Svetlikova Z, Skovierova H, Niederweis M et al. Role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 4015-8.
67. Howard ST, Byrd TF. The rapidly growing mycobacteria: saprophytes and parasites. *Microbes Infect* 2000; **2**: 1845-53.
68. Aubry A, Chosidow O, Caumes E et al. Sixty-three cases of *Mycobacterium marinum* infection: clinical features, treatment, and antibiotic susceptibility of causative isolates. *Arch Intern Med* 2002; **162**: 1746-52.
69. Elston D. Nontuberculous mycobacterial skin infections: recognition and management. *Am J Clin Dermatol* 2009; **10**: 281-5.
70. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 1387-92.
71. Williams MM, Domingo JW, Meckes MC et al. Phylogenetic diversity of drinking water bacteria in a distribution system simulator. *J Appl Microbiol* 2004; **96**: 954-64.
72. Berry D, Xi C, Raskin L. Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Curr Opin Biotechnol* 2006; **17**: 297-302.
73. Eichler S, Christen R, Holtje C et al. Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 1858-72.
74. Poitelon JB, Joyeux M, Welte B et al. Assessment of phylogenetic diversity of bacterial microflora in drinking water using serial analysis of ribosomal sequence tags. *Water Res* 2009; **43**: 4197-206.
75. Revetta RP, Pemberton A, Lamendella R et al. Identification of bacterial populations in drinking water using 16S rRNA-based sequence analyses. *Water Res* 2010; **44**: 1353-60.
76. Armbruster CR, Forster TS, Donlan RM et al. A biofilm model developed to investigate survival and disinfection of *Mycobacterium mucogenicum* in potable water. *Biofouling* 2012; **28**: 1129-39.
77. Simoes LC, Simoes M, Vieira MJ. Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2010; **98**: 317-29.
78. Wang H, Edwards MA, Falkinham JO, 3rd et al. Probiotic approach to pathogen control in premise plumbing systems? A review. *Environ Sci Technol* 2013; **47**: 10117-28.
79. Henne K, Kahlisch L, Brettar I et al. Analysis of structure and composition of bacterial core communities in mature drinking water biofilms and bulk water of a citywide network in Germany. *Appl Environ Microbiol* 2012; **78**: 3530-8.
80. Kahlisch L, Henne K, Grobe L et al. Assessing the viability of bacterial species in drinking water by combined cellular and molecular analyses. *Microb Ecol* 2012; **63**: 383-97.
81. Falkinham JO, 3rd. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol* 2009; **107**: 356-67.

82. Kirschner RA, Jr., Parker BC, Falkinham JO, 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* in acid, brown-water swamps of the southeastern United States and their association with environmental variables. *Am Rev Respir Dis* 1992; **145**: 271-5.
83. Falkinham lii JO. The biology of environmental mycobacteria. *Environ Microbiol Rep* 2009; **1**: 477-87.
84. Hernandez-Garduno E, Elwood K. Nontuberculous mycobacteria in tap water. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: 353.
85. Vaerewijck MJ, Huys G, Palomino JC et al. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiol Rev* 2005; **29**: 911-34.
86. Mullis SN, Falkinham JO, 3rd. Adherence and biofilm formation of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium abscessus* to household plumbing materials. *J Appl Microbiol* 2013; **115**: 908-14.
87. Hall-Stoodley L, Lappin-Scott H. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; **168**: 77-84.
88. Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol* 2005; **13**: 7-10.
89. Collins CH, Grange JM, Yates MD. Mycobacteria in water. *J Appl Bacteriol* 1984; **57**: 193-211.
90. Falkinham JO, 3rd, Norton CD, LeChevallier MW. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other Mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 2001; **67**: 1225-31.
91. van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W et al. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microbiol* 1987; **53**: 1893-7.
92. Fletcher M, Loeb GI. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 1979; **37**: 67-72.
93. Pringle JH, Fletcher M. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 1983; **45**: 1963.
94. Phillips MS, von Reyn CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 1363-74.
95. Falkinham JO, 3rd, Iseman MD, de Haas P et al. *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. *J Water Health* 2008; **6**: 209-13.
96. Feazel LM, Baumgartner LK, Peterson KL et al. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 16393-9.
97. De Groote MA, Pace NR, Fulton K et al. Relationships between *Mycobacterium* isolates from patients with pulmonary mycobacterial infection and potting soils. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 7602-6.

98. Wagner D, Young LS. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. *Infection* 2004; **32**: 257-70.
99. von Reyn CF, Maslow JN, Barber TW et al. Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* 1994; **343**: 1137-41.
100. Bryant JM, Grogono DM, Greaves D et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet* 2013; **381**: 1551-60.
101. Han XY, De I, Jacobson KL. Rapidly growing mycobacteria: clinical and microbiologic studies of 115 cases. *Am J Clin Pathol* 2007; **128**: 612-21.
102. Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J* 2013; **42**: 1604-13.
103. Yeager H. Nontuberculous Mycobacteria-Introduction. In: Schlossberg D, ed. *Tuberculous and Nontuberculous Mycobacterial Infections*. ASM Press, Washington, DC, 2011; 528.
104. Sugimoto H, Ito M, Hatano M et al. A case of chronic otitis media caused by *Mycobacterium abscessus*. *Auris Nasus Larynx* 2010; **37**: 636-9.
105. Senda H, Muro H, Terada S. Flexor tenosynovitis caused by *Mycobacterium arupense*. *J Hand Surg Eur Vol* 2011; **36**: 72-3.
106. Adekambi T, Stein A, Carvajal J et al. Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum* group organism isolated from a posttraumatic osteitis inflammation. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 1268-73.
107. Mastroianni A. *Mycobacterium flavescens* vertebral osteomyelitis in an immunocompetent host. *Infez Med* 2003; **11**: 97-101.
108. Friedman ND, Sexton DJ. Bursitis due to *Mycobacterium goodii*, a recently described, rapidly growing mycobacterium. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 404-5.
109. Sampaio JL, Junior DN, de Freitas D et al. An outbreak of keratitis caused by *Mycobacterium immunogenum*. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 3201-7.
110. van der Heijden IM, Wilbrink B, Schouls LM et al. Detection of mycobacteria in joint samples from patients with arthritis using a genus-specific polymerase chain reaction and sequence analysis. *Rheumatology (Oxford)* 1999; **38**: 547-53.
111. Kondo A, Mori K, Iwata J et al. Caseous necrotic granuloma in the pituitary stalk due to nontuberculous Mycobacteria (*Mycobacterium tokaiense*) infection--case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2006; **46**: 80-3.
112. Chu HS, Hu FR. Non-tuberculous mycobacterial keratitis. *Clin Microbiol Infect* 2013; **19**: 221-6.
113. Renaud CJ, Subramanian S, Tambyah PA et al. The clinical course of rapidly growing nontuberculous mycobacterial peritoneal dialysis infections in Asians: A case series and literature review. *Nephrology (Carlton)* 2011; **16**: 174-9.

114. Kiska DL, Turenne CY, Dubansky AS et al. First case report of catheter-related bacteremia due to "Mycobacterium lacticola". *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 2855-7.
115. Jonsson G, Rydberg J, Sturegard E et al. A case of Mycobacterium goodii prosthetic valve endocarditis in a non-immunocompromised patient: use of 16S rDNA analysis for rapid diagnosis. *BMC Infect Dis* 2012; **12**: 301.
116. Delrieu F, Slaoui O, Evrard J et al. [Mycobacterial infection of the hip following total prosthesis. Study of 6 cases]. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1986; **53**: 113-8.
117. Rahav G, Pitlik S, Amitai Z et al. An outbreak of Mycobacterium jacuzzii infection following insertion of breast implants. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: 823-30.
118. Duarte RS, Lourenco MC, Fonseca Lde S et al. Epidemic of postsurgical infections caused by Mycobacterium massiliense. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 2149-55.
119. Shaaban H, Layne T, Sensakovic JW et al. Mycobacterium kansasii septicemia in an AIDS patient complicated by acute respiratory distress syndrome and acute liver failure. *Int J STD AIDS* 2013.
120. Brown-Elliott BA, Griffith DE, Wallace RJ, Jr. Newly described or emerging human species of nontuberculous mycobacteria. *Infect Dis Clin North Am* 2002; **16**: 187-220.
121. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Jr. et al. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; **167**: 828-34.
122. Petrini B. Mycobacterium abscessus: an emerging rapid-growing potential pathogen. *APMIS* 2006; **114**: 319-28.
123. Sohail MR, Smilack JD. Hernia repair mesh-associated Mycobacterium goodii infection. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 2858-60.
124. Schinsky MF, Morey RE, Steigerwalt AG et al. Taxonomic variation in the Mycobacterium fortuitum third biovariant complex: description of Mycobacterium boenickei sp. nov., Mycobacterium houstonense sp. nov., Mycobacterium neworleansense sp. nov. and Mycobacterium brisbanense sp. nov. and recognition of Mycobacterium porcinum from human clinical isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; **54**: 1653-67.
125. van Ingen J, Bendien SA, de Lange WC et al. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax* 2009; **64**: 502-6.
126. van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med* 2013; **34**: 103-9.
127. Simons S, van Ingen J, Hsueh PR et al. Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 343-9.
128. Weiss CH, Glassroth J. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Expert Rev Respir Med* 2012; **6**: 597-612; quiz 3.
129. Massenkeil G, Opravil M, Salfinger M et al. Disseminated coinfection with Mycobacterium avium complex and Mycobacterium kansasii in a patient with AIDS and liver abscess. *Clin Infect Dis* 1992; **14**: 618-9.

130. Torres RA, Nord J, Feldman R et al. Disseminated mixed *Mycobacterium simiae*-*Mycobacterium avium* complex infection in acquired immunodeficiency syndrome. *J Infect Dis* 1991; **164**: 432-3.
131. Kim JS, Tanaka N, Newell JD et al. Nontuberculous mycobacterial infection: CT scan findings, genotype, and treatment responsiveness. *Chest* 2005; **128**: 3863-9.
132. Jarand J, Levin A, Zhang L et al. Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. *Clin Infect Dis* 2011; **52**: 565-71.
133. Kurahara Y, Tachibana K, Tsuyuguchi K et al. Mixed pulmonary infection with three types of nontuberculous mycobacteria. *Intern Med* 2013; **52**: 507-10.
134. El Helou G, Hachem R, Viola GM et al. Management of rapidly growing mycobacterial bacteremia in cancer patients. *Clin Infect Dis* 2013; **56**: 843-6.
135. McCracken D, Flanagan P, Hill D et al. Cluster of cases of *Mycobacterium chelonae* bacteraemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; **19**: 43-6.
136. Gopinath K, Singh S. Non-tuberculous mycobacteria in TB-endemic countries: are we neglecting the danger? *PLoS Negl Trop Dis* 2010; **4**: e615.
137. Yamazaki Y, Danelishvili L, Wu M et al. The ability to form biofilm influences *Mycobacterium avium* invasion and translocation of bronchial epithelial cells. *Cell Microbiol* 2006; **8**: 806-14.
138. van Dissel JT, Kuijper EJ. Rapidly growing mycobacteria: emerging pathogens in cosmetic procedures of the skin. *Clin Infect Dis* 2009; **49**: 1365-8.
139. Winthrop KL, Abrams M, Yakus M et al. An outbreak of mycobacterial furunculosis associated with footbaths at a nail salon. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1366-71.
140. Vugia DJ, Jang Y, Zizek C et al. Mycobacteria in nail salon whirlpool footbaths, California. *Emerg Infect Dis* 2005; **11**: 616-8.
141. Redbord KP, Shearer DA, Gloster H et al. Atypical *Mycobacterium furunculosis* occurring after pedicures. *J Am Acad Dermatol* 2006; **54**: 520-4.
142. Snizek PJ, Graham BS, Busch HB et al. Rapidly growing mycobacterial infections after pedicures. *Arch Dermatol* 2003; **139**: 629-34.
143. Udou T. Extracellular hemolytic activity in rapidly growing mycobacteria. *Can J Microbiol* 1994; **40**: 318-21.
144. Pang L, Tian X, Pan W et al. Structure and function of mycobacterium glycopeptidolipids from comparative genomics perspective. *J Cell Biochem* 2013; **114**: 1705-13.
145. Sexton P, Harrison AC. Susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung disease. *Eur Respir J* 2008; **31**: 1322-33.
146. Prince DS, Peterson DD, Steiner RM et al. Infection with *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions. *N Engl J Med* 1989; **321**: 863-8.
147. Rodman DM, Polis JM, Heltshe SL et al. Late diagnosis defines a unique population of long-term survivors of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; **171**: 621-6.

148. Kim RD, Greenberg DE, Ehrmantraut ME et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease: prospective study of a distinct preexisting syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; **178**: 1066-74.
149. Griffith DE. Nontuberculous mycobacterial lung disease. *Curr Opin Infect Dis* 2010; **23**: 185-90.
150. van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis* 2004; **4**: 739-49.
151. Koh WJ, Kwon OJ, Kim EJ et al. NRAMP1 gene polymorphism and susceptibility to nontuberculous mycobacterial lung diseases. *Chest* 2005; **128**: 94-101.
152. Crum NF, Lederman ER, Wallace MR. Infections associated with tumor necrosis factor-alpha antagonists. *Medicine (Baltimore)* 2005; **84**: 291-302.
153. Keane J. TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. *Rheumatology (Oxford)* 2005; **44**: 714-20.
154. Winthrop KL, Baxter R, Liu L et al. Mycobacterial diseases and antitumour necrosis factor therapy in USA. *Ann Rheum Dis* 2013; **72**: 37-42.
155. Winthrop KL, Chang E, Yamashita S et al. Nontuberculous mycobacteria infections and anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Emerg Infect Dis* 2009; **15**: 1556-61.
156. Okubo H, Iwamoto M, Yoshio T et al. Rapidly aggravated Mycobacterium avium infection in a patient with rheumatoid arthritis treated with infliximab. *Mod Rheumatol* 2005; **15**: 62-4.
157. Wallis RS, Broder MS, Wong JY et al. Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 1261-5.
158. Winthrop KL. Risk and prevention of tuberculosis and other serious opportunistic infections associated with the inhibition of tumor necrosis factor. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; **2**: 602-10.
159. McGarvey J, Bermudez LE. Pathogenesis of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin Chest Med* 2002; **23**: 569-83.
160. Koh WJ, Kwon OJ, Jeon K et al. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens in Korea. *Chest* 2006; **129**: 341-8.
161. Hale YM, Pfyffer GE, Salfinger M. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 834-46.
162. Hall L, Doerr KA, Wohlfiel SL et al. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 1447-53.
163. Clarridge JE, 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004; **17**: 840-62, table of contents.
164. Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S et al. hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 852-7.

165. Adekambi T, Colson P, Drancourt M. rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 5699-708.
166. Rogall T, Flohr T, Bottger EC. Differentiation of Mycobacterium species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol* 1990; **136**: 1915-20.
167. Schulz S, Cabras AD, Hofler H et al. Molecular diagnosis of a Mycobacterium chelonae infection. *Pathol Res Pract* 2001; **197**: 583-4.
168. Cook SM, Bartos RE, Pierson CL et al. Detection and characterization of atypical mycobacteria by the polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1994; **3**: 53-8.
169. Iakhiaeva E, McNulty S, Brown Elliott BA et al. Mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat (MIRU-VNTR) genotyping of mycobacterium intracellulare for strain comparison with establishment of a PCR-based database. *J Clin Microbiol* 2013; **51**: 409-16.
170. Alcaide F, Esteban J, González J et al. Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Micobacterias. In: Cercenado E, Cantón R, eds. *SEIMC*, 2005.
171. Hett EC, Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; **72**: 126-56, table of contents.
172. Riley LW. Of mice, men, and elephants: Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and pathogenesis. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1475-8.
173. Springer B, Stockman L, Teschner K et al. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 296-303.
174. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR et al. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 1790-4.
175. Wickremasinghe M, Ozerovitch LJ, Davies G et al. Non-tuberculous mycobacteria in patients with bronchiectasis. *Thorax* 2005; **60**: 1045-51.
176. Shin SJ, Choi GE, Cho SN et al. Mycobacterial genotypes are associated with clinical manifestation and progression of lung disease caused by Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense. *Clin Infect Dis* 2013; **57**: 32-9.
177. Andersen P, Doherty TM. The success and failure of BCG - implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Microbiol* 2005; **3**: 656-62.
178. Fine PE, Floyd S, Stanford JL et al. Environmental mycobacteria in northern Malawi: implications for the epidemiology of tuberculosis and leprosy. *Epidemiol Infect* 2001; **126**: 379-87.
179. Huang JH, Kao PN, Adi V et al. Mycobacterium avium-intracellulare pulmonary infection in HIV-negative patients without preexisting lung disease: diagnostic and management limitations. *Chest* 1999; **115**: 1033-40.
180. Gubler JG, Salfinger M, von Graevenitz A. Pseudoepidemic of nontuberculous mycobacteria due to a contaminated bronchoscope cleaning machine. Report of an outbreak and review of the literature. *Chest* 1992; **101**: 1245-9.

181. Ortiz A, Esteban J, Zamora N. Molecular identification by random amplified polymorphic DNA analysis of a pseudo-outbreak of *Mycobacterium fortuitum* due to cross-contamination of clinical samples. *J Med Microbiol* 2007; **56**: 871-2.
182. Glassroth J. Pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria. *Chest* 2008; **133**: 243-51.
183. Henry MT, Inamdar L, O'Riordain D et al. Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. *Eur Respir J* 2004; **23**: 741-6.
184. Uslan DZ, Kowalski TJ, Wengenack NL et al. Skin and soft tissue infections due to rapidly growing mycobacteria: comparison of clinical features, treatment, and susceptibility. *Arch Dermatol* 2006; **142**: 1287-92.
185. Liao CH, Lai CC, Ding LW et al. Skin and soft tissue infection caused by non-tuberculous mycobacteria. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; **11**: 96-102.
186. Bhatta H, Goldys EM, Learmonth RP. Use of fluorescence spectroscopy to differentiate yeast and bacterial cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; **71**: 121-6.
187. Alimova A, Katz A, Savage HE et al. Native fluorescence and excitation spectroscopic changes in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* bacteria subjected to conditions of starvation. *Appl Opt* 2003; **42**: 4080-7.
188. Giana HE, Silveira L, Zangaro RA et al. Rapid identification of bacterial species by fluorescence spectroscopy and classification through principal component analysis. *Journal of Fluorescence* 2003; **13**: 489-93.
189. Whipps CM, Moss LG, Sisk DM et al. Detection of autofluorescent mycobacterium chelonae in living zebrafish. *Zebrafish* 2014; **11**: 76-82.
190. van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D et al. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resist Updat* 2012; **15**: 149-61.
191. Nash KA, Zhang Y, Brown-Elliott BA et al. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in clinical isolates of *Mycobacterium fortuitum*. *J Antimicrob Chemother* 2005; **55**: 170-7.
192. Nash KA. Intrinsic macrolide resistance in *Mycobacterium smegmatis* is conferred by a novel erm gene, erm(38). *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3053-60.
193. Aberg JA, Wong MK, Flamm R et al. Presence of macrolide resistance in respiratory flora of HIV-Infected patients receiving either clarithromycin or azithromycin for *Mycobacterium avium* complex prophylaxis. *HIV Clin Trials* 2001; **2**: 453-9.
194. Yang SC, Hsueh PR, Lai HC et al. High prevalence of antimicrobial resistance in rapidly growing mycobacteria in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 1958-62.
195. Cavusoglu C, Soyler I, Akinci P. Activities of Linezolid against nontuberculous mycobacteria. *New Microbiol* 2007; **30**: 411-4.
196. Fernandez-Roblas R, Esteban J, Cabria F et al. In vitro susceptibilities of rapidly growing mycobacteria to telithromycin (HMR 3647) and seven other antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 181-2.

197. Wallace RJ, Jr., Brown-Elliott BA, Crist CJ et al. Comparison of the in vitro activity of the glycycline tigecycline (formerly GAR-936) with those of tetracycline, minocycline, and doxycycline against isolates of nontuberculous mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 3164-7.
198. Shen GH, Wu BD, Wu KM et al. In Vitro activities of isepamicin, other aminoglycosides, and capreomycin against clinical isolates of rapidly growing mycobacteria in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1849-51.
199. Adekambi T. Mycobacterium mucogenicum group infections: a review. *Clin Microbiol Infect* 2009; **15**: 911-8.
200. Huang YC, Liu MF, Shen GH et al. Clinical outcome of Mycobacterium abscessus infection and antimicrobial susceptibility testing. *J Microbiol Immunol Infect* 2010; **43**: 401-6.
201. Wallace RJ, Jr., Brown BA, Onyi GO. Skin, soft tissue, and bone infections due to Mycobacterium chelonae chelonae: importance of prior corticosteroid therapy, frequency of disseminated infections, and resistance to oral antimicrobials other than clarithromycin. *J Infect Dis* 1992; **166**: 405-12.
202. van Ingen J, van der Laan T, Dekhuijzen R et al. In vitro drug susceptibility of 2275 clinical non-tuberculous Mycobacterium isolates of 49 species in The Netherlands. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**: 169-73.
203. Lambert PA. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 2002: 46S-54S.
204. CLSI. *Susceptibility testing of Mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard.*, 2011.
205. Woods GL, Bergmann JS, Witebsky FG et al. Multisite reproducibility of results obtained by the broth microdilution method for susceptibility testing of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium chelonae, and Mycobacterium fortuitum. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 1676-82.
206. Woods GL. Susceptibility testing for mycobacteria. *Clin Infect Dis* 2000; **31**: 1209-15.
207. Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Garcia-Almeida D et al. Prevalence of erm methylase genes in clinical isolates of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Infect* 2009; **15**: 919-23.
208. Nash KA, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Jr. A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of Mycobacterium abscessus but is absent from Mycobacterium chelonae. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1367-76.
209. Bastian S, Veziris N, Roux AL et al. Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the Mycobacterium abscessus group by erm(41) and rrl sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 775-81.
210. Ainsa JA, Blokpoel MC, Otal I et al. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium tuberculosis. *J Bacteriol* 1998; **180**: 5836-43.
211. De Rossi E, Blokpoel MC, Cantoni R et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, tet(V), from Mycobacterium smegmatis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 1931-7.

212. Sander P, De Rossi E, Boddingtonhaus B et al. Contribution of the multidrug efflux pump LfrA to innate mycobacterial drug resistance. *FEMS Microbiol Lett* 2000; **193**: 19-23.
213. Li XZ, Zhang L, Nikaido H. Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 2415-23.
214. Wallace RJ, Jr., Meier A, Brown BA et al. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 1676-81.
215. Tebas P, Sultan F, Wallace RJ, Jr. et al. Rapid development of resistance to clarithromycin following monotherapy for disseminated *Mycobacterium chelonae* infection in a heart transplant patient. *Clin Infect Dis* 1995; **20**: 443-4.
216. Nessar R, Reytrat JM, Murray A et al. Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1719-24.
217. Guillemain I, Jarlier V, Cambau E. Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; **42**: 2084-8.
218. Esteban J, Martin-de-Hijas NZ, Ortiz A et al. Detection of lfrA and tap efflux pump genes among clinical isolates of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **34**: 454-6.
219. Schmalstieg AM, Srivastava S, Belkaya S et al. The antibiotic resistance arrow of time: efflux pump induction is a general first step in the evolution of mycobacterial drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4806-15.
220. Griffith DE, Wallace RJ, Jr. New developments in the treatment of nontuberculous mycobacterial (NTM) disease. *Semin Respir Infect* 1996; **11**: 301-10.
221. Brown-Elliott B, Wallace R. Rapidly Growing Mycobacteria. In: Schlossberg D, ed. *Tuberculous and Nontuberculous Mycobacterial Infections*. ASM Press, Washington, DC, 2011; 570.
222. Nash KA, Andini N, Zhang Y et al. Intrinsic macrolide resistance in rapidly growing mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3476-8.
223. Andini N, Nash KA. Intrinsic macrolide resistance of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is inducible. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2560-2.
224. Buriankova K, Doucet-Populaire F, Dorson O et al. Molecular basis of intrinsic macrolide resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 143-50.
225. Madsen CT, Jakobsen L, Buriankova K et al. Methyltransferase Erm(37) slips on rRNA to confer atypical resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2005; **280**: 38942-7.
226. Madsen CT, Jakobsen L, Douthwaite S. *Mycobacterium smegmatis* Erm(38) is a reluctant dimethyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3803-9.
227. da Costa AR, Lopes ML, Leao SC et al. Molecular identification of rapidly growing mycobacteria isolates from pulmonary specimens of patients in the State of Para, Amazon region, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; **65**: 358-64.

228. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; **8**: 881-90.
229. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978; **238**: 86-95.
230. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE et al. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; **49**: 711-45.
231. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; **54**: 49-79.
232. Martin-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J et al. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation. A multi-country retrospective survey. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; **8**: 1186-93.
233. Martin-de-Hijas NZ, Garcia-Almeida D, Ayala G et al. Biofilm development by clinical strains of non-pigmented rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Infect* 2009; **15**: 931-6.
234. Zamora N, Esteban J, Kinnari TJ et al. In-vitro evaluation of the adhesion to polypropylene sutures of non-pigmented, rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Infect* 2007; **13**: 902-7.
235. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; **284**: 1318-22.
236. Dunne WM, Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002; **15**: 155-66.
237. Xavier JB, Foster KR. Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 876-81.
238. Hall-Stoodley L, Stoodley P, Kathju S et al. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; **65**: 127-45.
239. Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* 2007; **189**: 7945-7.
240. Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D et al. Growth of Mycobacterium tuberculosis biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol Microbiol* 2008; **69**: 164-74.
241. Petrova OE, Sauer K. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *J Bacteriol* 2012; **194**: 2413-25.
242. Sauer K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* 2003; **4**: 219.
243. Diaz PI. Microbial diversity and interactions in subgingival biofilm communities. *Front Oral Biol* 2012; **15**: 17-40.
244. Sanclement JA, Webster P, Thomas J et al. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2005; **115**: 578-82.
245. Ramadan HH, Sanclement JA, Thomas JG. Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; **132**: 414-7.
246. Ramadan HH. Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; **14**: 183-6.

247. Abraham NM, Lamletth S, Fowler VG et al. Chelating agents exert distinct effects on biofilm formation in *Staphylococcus aureus* depending on strain background: role for clumping factor B. *J Med Microbiol* 2012; **61**: 1062-70.
248. Rosenberg M, Bayer EA, Delarea J et al. Role of Thin Fimbriae in Adherence and Growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on Hexadecane. *Appl Environ Microbiol* 1982; **44**: 929-37.
249. Hernandez RT, Velsko I, Sampaio SC et al. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 2011; **77**: 8391-9.
250. Cucarella C, Solano C, Valle J et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 2001; **183**: 2888-96.
251. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2001; **67**: 4538-45.
252. Menzies BE. The role of fibronectin binding proteins in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Curr Opin Infect Dis* 2003; **16**: 225-9.
253. Switalski LM, Patti JM, Butcher W et al. A collagen receptor on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with septic arthritis mediates adhesion to cartilage. *Mol Microbiol* 1993; **7**: 99-107.
254. Ni Eidhin D, Perkins S, Francois P et al. Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1998; **30**: 245-57.
255. McDevitt D, Nanavaty T, House-Pompeo K et al. Characterization of the interaction between the *Staphylococcus aureus* clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *Eur J Biochem* 1997; **247**: 416-24.
256. Stoodley P, Sauer K, Davies DG et al. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002; **56**: 187-209.
257. Fey PD, Olson ME. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol* 2010; **5**: 917-33.
258. Ubeda C, Tormo MA, Cucarella C et al. Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* 2003; **49**: 193-210.
259. Bauer WD, Robinson JB. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. *Curr Opin Biotechnol* 2002; **13**: 234-7.
260. Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; **21**: 319-46.
261. Camilli A, Bassler BL. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science* 2006; **311**: 1113-6.
262. Ng WL, Bassler BL. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* 2009; **43**: 197-222.
263. Du J, Zhao C, Wang X. [Research progresses on the pathogenesis of bacterial biofilm in chronic rhinosinusitis]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2013; **27**: 446-8.

264. Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ. The role of bacterial surface structures in pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* 1981; **8**: 303-38.
265. Post JC, Hiller NL, Nistico L et al. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; **15**: 347-51.
266. Marrie TJ, Nelligan J, Costerton JW. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* 1982; **66**: 1339-41.
267. Anderson GG, Dodson KW, Hooton TM et al. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol* 2004; **12**: 424-30.
268. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis* 2001; **7**: 277-81.
269. Maki DG, Weise CE, Sarafin HW. A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 1977; **296**: 1305-9.
270. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; **15**: 167-93.
271. Kite P, Dobbins BM, Wilcox MH et al. Evaluation of a novel endoluminal brush method for in situ diagnosis of catheter related sepsis. *J Clin Pathol* 1997; **50**: 278-82.
272. Raad, II, Sabbagh MF, Rand KH et al. Quantitative tip culture methods and the diagnosis of central venous catheter-related infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992; **15**: 13-20.
273. Tenney JH, Moody MR, Newman KA et al. Adherent microorganisms on luminal surfaces of long-term intravenous catheters. Importance of *Staphylococcus epidermidis* in patients with cancer. *Arch Intern Med* 1986; **146**: 1949-54.
274. Sherertz RJ, Raad, II, Belani A et al. Three-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 1990; **28**: 76-82.
275. Donlan RM, Murga R, Bell M et al. Protocol for detection of biofilms on needleless connectors attached to central venous catheters. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 750-3.
276. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med* 2007; **357**: 654-63.
277. Esteban J, Sorli L, Alentorn-Geli E et al. Conventional and molecular diagnostic strategies for prosthetic joint infections. *Expert Rev Mol Diagn* 2014; **14**: 83-96.
278. Islam MS, Richards JP, Ojha AK. Targeting drug tolerance in mycobacteria: a perspective from mycobacterial biofilms. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; **10**: 1055-66.
279. Wu JA, Kusuma C, Mond JJ et al. Lysostaphin disrupts *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on artificial surfaces. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3407-14.
280. Roberts AP, Pratten J, Wilson M et al. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol Lett* 1999; **177**: 63-6.
281. Hausner M, Wuertz S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol* 1999; **65**: 3710-3.

282. Christensen BB, Sternberg C, Andersen JB et al. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl Environ Microbiol* 1998; **64**: 2247-55.
283. Endimiani A, Carias LL, Hujer AM et al. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing blaKPC in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2680-2.
284. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; **9**: 34-9.
285. Tetz VV, Rybalchenko OV, Savkova GA. Ultrastructure of the surface film of bacterial colonies. *J Gen Microbiol* 1993; **139**: 855-8.
286. Hoyle BD, Costerton JW. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog Drug Res* 1991; **37**: 91-105.
287. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; **41**: 435-64.
288. Chambless JD, Hunt SM, Stewart PS. A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 2005-13.
289. Chaw KC, Manimaran M, Tay FE. Role of silver ions in destabilization of intermolecular adhesion forces measured by atomic force microscopy in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4853-9.
290. de Beer D, Stoodley P, Roe F et al. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol Bioeng* 1994; **43**: 1131-8.
291. Tresse O, Jouenne T, Junter GA. The role of oxygen limitation in the resistance of agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* to aminoglycoside and beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1995; **36**: 521-6.
292. Xu KD, Stewart PS, Xia F et al. Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl Environ Microbiol* 1998; **64**: 4035-9.
293. Stewart PS. Biofilm accumulation model that predicts antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**: 1052-8.
294. Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J* 2000; **46**: S47-52.
295. Williams I, Venables WA, Lloyd D et al. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 1997; **143** (Pt 7): 2407-13.
296. Ceri H, Olson ME, Turner RJ. Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin Pharmacother* 2010; **11**: 1233-7.
297. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The Exopolysaccharide Matrix: A Virulence Determinant of Cariogenic Biofilm. *J Dent Res* 2013.
298. Pollanen MT, Paino A, Ihalin R. Environmental stimuli shape biofilm formation and the virulence of periodontal pathogens. *Int J Mol Sci* 2013; **14**: 17221-37.

299. Harrison JJ, Ceri H, Roper NJ et al. Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. *Microbiology* 2005; **151**: 3181-95.
300. Keren I, Kaldalu N, Spoering A et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 2004; **230**: 13-8.
301. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 2007; **5**: 48-56.
302. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002; **292**: 107-13.
303. Singh B, Ghosh J, Islam NM et al. Growth, cell division and sporulation in mycobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2010; **98**: 165-77.
304. Ghosh J, Larsson P, Singh B et al. Sporulation in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 10781-6.
305. Redelman-Sidi G, Sepkowitz KA. Rapidly growing mycobacteria infection in patients with cancer. *Clin Infect Dis* 2010; **51**: 422-34.
306. Washer LL, Riddell Jt, Rider J et al. Mycobacterium neoaurum bloodstream infection: report of 4 cases and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2007; **45**: e10-3.
307. Raad, II, Vartivarian S, Khan A et al. Catheter-related infections caused by the Mycobacterium fortuitum complex: 15 cases and review. *Rev Infect Dis* 1991; **13**: 1120-5.
308. Livni G, Yaniv I, Samra Z et al. Outbreak of Mycobacterium mucogenicum bacteraemia due to contaminated water supply in a paediatric haematology-oncology department. *J Hosp Infect* 2008; **70**: 253-8.
309. Reilly AF, McGowan KL. Atypical mycobacterial infections in children with cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2004; **43**: 698-702.
310. Roy V, Weisdorf D. Mycobacterial infections following bone marrow transplantation: a 20 year retrospective review. *Bone Marrow Transplant* 1997; **19**: 467-70.
311. Gavia JM, Garcia PJ, Garrido SM et al. Nontuberculous mycobacterial infections in hematopoietic stem cell transplant recipients: characteristics of respiratory and catheter-related infections. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; **6**: 361-9.
312. Antoci V, Jr., Adams CS, Parvizi J et al. The inhibition of Staphylococcus epidermidis biofilm formation by vancomycin-modified titanium alloy and implications for the treatment of periprosthetic infection. *Biomaterials* 2008; **29**: 4684-90.
313. Casey AL, Mermel LA, Nightingale P et al. Antimicrobial central venous catheters in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2008; **8**: 763-76.
314. McConnell SA, Gubbins PO, Anaissie EJ. Do antimicrobial-impregnated central venous catheters prevent catheter-related bloodstream infection? *Clin Infect Dis* 2003; **37**: 65-72.
315. Hockenhull JC, Dwan KM, Smith GW et al. The clinical effectiveness of central venous catheters treated with anti-infective agents in preventing catheter-related bloodstream infections: a systematic review. *Crit Care Med* 2009; **37**: 702-12.

316. Niel-Weise BS, Stijnen T, van den Broek PJ. Anti-infective-treated central venous catheters: a systematic review of randomized controlled trials. *Intensive Care Med* 2007; **33**: 2058-68.
317. Darouiche RO, Raad II, Heard SO et al. A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters. Catheter Study Group. *N Engl J Med* 1999; **340**: 1-8.
318. Maki DG, Stolz SM, Wheeler S et al. Prevention of central venous catheter-related bloodstream infection by use of an antiseptic-impregnated catheter. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1997; **127**: 257-66.
319. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ et al. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 2005; **436**: 1171-5.
320. Stobie N, Duffy B, McCormack DE et al. Prevention of Staphylococcus epidermidis biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating. *Biomaterials* 2008; **29**: 963-9.
321. Pérez-Tanoira R. Incorporación de plata para incrementar las propiedades antimicrobianas de aleaciones de titanio. Madrid: Universidad Complutense de Madrid (UCM), 2014.
322. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 2009; **27**: 76-83.
323. Jena P, Mohanty S, Mallick R et al. Toxicity and antibacterial assessment of chitosan-coated silver nanoparticles on human pathogens and macrophage cells. *Int J Nanomedicine* 2012; **7**: 1805-18.
324. Feng QL, Wu J, Chen GQ et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *J Biomed Mater Res* 2000; **52**: 662-8.
325. Perez-Giraldo C, Rodriguez-Benito A, Moran FJ et al. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by Staphylococcus epidermidis. *J Antimicrob Chemother* 1997; **39**: 643-6.
326. Raad I, Rosenblatt J, Reitzel R et al. Chelator-based catheter lock solutions in eradicating organisms in biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 586-8.
327. Zhao T, Liu Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by Pseudomonas aeruginosa. *BMC Microbiol* 2010; **10**: 140.
328. Kiedrowski MR, Horswill AR. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Ann N Y Acad Sci* 2011; **1241**: 104-21.
329. Zegans ME, Wozniak D, Griffin E et al. Pseudomonas aeruginosa exopolysaccharide Psl promotes resistance to the biofilm inhibitor polysorbate 80. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 4112-22.
330. Chen M, Yu Q, Sun H. Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *Int J Mol Sci* 2013; **14**: 18488-501.
331. Munoz-Egea MC, Garcia-Pedrazuela M, Mahillo I et al. Autofluorescence as a tool for structural analysis of biofilms formed by nonpigmented rapidly growing mycobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2013; **79**: 1065-7.
332. Esteban J, Fernandez Roblas R, Garcia Cia JJ et al. Clinical significance and epidemiology of non-pigmented rapidly growing mycobacteria in a university hospital. *J Infect* 2007; **54**: 135-45.

333. Burns DN, Wallace RJ, Jr., Schultz ME et al. Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with *Mycobacterium fortuitum*: demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation. *Am Rev Respir Dis* 1991; **144**: 1153-9.
334. Wallace RJ, Jr., Brown BA, Griffith DE. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* 1998; **52**: 453-90.
335. Wallace RJ, Jr., Swenson JM, Silcox VA et al. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. *Rev Infect Dis* 1983; **5**: 657-79.
336. Kuritsky JN, Bullen MG, Broome CV et al. Sternal wound infections and endocarditis due to organisms of the *Mycobacterium fortuitum* complex. *Ann Intern Med* 1983; **98**: 938-9.
337. Olalla J, Pombo M, Aguado JM et al. *Mycobacterium fortuitum* complex endocarditis-case report and literature review. *Clin Microbiol Infect* 2002; **8**: 125-9.
338. Darouiche RO. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 1567-72.
339. Kumar V, Sachan TK, Sharma P et al. Ultrastructural Morphologic Changes in Mycobacterial Biofilm in Different Extreme Condition. *Ultrastruct Pathol* 2014: 1-11.
340. Garcia-Martos P, Garcia-Agudo L. [Infections due to rapidly growing mycobacteria]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; **30**: 192-200.
341. Stewart PS. Biophysics of Biofilm Infection. *Pathog Dis* 2013.
342. Raad I, Costerton W, Sabharwal U et al. Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis* 1993; **168**: 400-7.
343. Costerton JW. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res* 2005: 7-11.
344. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; **2**: 95-108.
345. Martín-de-Hijas NZ. Sobre mecanismos de resistencia antimicrobiana y desarrollo de biopelículas en su relación con la patogenicidad de las micobacterias no pigmentadas de crecimiento rápido Madrid: Universidad Complutense de Madrid (UCM), 2012.
346. Pesciaroli L, Petruccioli M, Fedi S et al. Characterization of *Pleurotus ostreatus* biofilms by using the calgary biofilm device. *Appl Environ Microbiol* 2013; **79**: 6083-92.
347. Alhajlan M, Alhariri M, Omri A. Efficacy and safety of liposomal clarithromycin and its effect on *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 2694-704.
348. Santopolo L, Marchi E, Frediani L et al. A novel approach combining the Calgary Biofilm Device and Phenotype MicroArray for the characterization of the chemical sensitivity of bacterial biofilms. *Biofouling* 2012; **28**: 1023-32.
349. Doran JL, Pang Y, Mdluli KE et al. *Mycobacterium tuberculosis* *efpA* encodes an efflux protein of the QacA transporter family. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; **4**: 23-32.

350. Liu J, Takiff HE, Nikaido H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. *J Bacteriol* 1996; **178**: 3791-5.
351. Kwon HH, Tomioka H, Saito H. Distribution and characterization of beta-lactamases of mycobacteria and related organisms. *Tuber Lung Dis* 1995; **76**: 141-8.
352. Prabhakaran K, Harris EB, Randhawa B et al. beta-Lactamase activity in mycobacteria including *Mycobacterium avium* and suppression of their growth by a beta-lactamase-stable antibiotic. *Microbios* 1995; **81**: 177-85.
353. Wallace RJ, Jr., Hull SI, Bobey DG et al. Mutational resistance as the mechanism of acquired drug resistance to aminoglycosides and antibacterial agents in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae*. Evidence is based on plasmid analysis, mutational frequencies, and aminoglycoside-modifying enzyme assays. *Am Rev Respir Dis* 1985; **132**: 409-16.
354. Pang Y, Brown BA, Steingrube VA et al. Tetracycline resistance determinants in *Mycobacterium* and *Streptomyces* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; **38**: 1408-12.
355. Gomes F, Leite B, Teixeira P et al. Farnesol in combination with N-acetylcysteine against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm cells. *Braz J Microbiol* 2012; **43**: 235-42.
356. Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* 2003; **69**: 4814-22.
357. Teixeira PC, Leite GM, Domingues RJ et al. Antimicrobial effects of a microemulsion and a nanoemulsion on enteric and other pathogens and biofilms. *Int J Food Microbiol* 2007; **118**: 15-9.
358. Marchese A, Bozzolasco M, Gualco L et al. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2003; **22 Suppl 2**: 95-100.

9. ANEXO: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS
